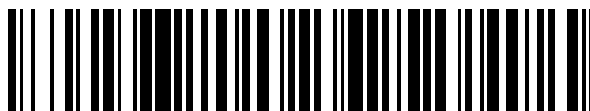


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 584**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12780356 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2750713**

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

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547187 P

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB y
GENENTECH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FLYGARE, JOHN A.;
GUNZNER-TOSTE, JANET L.;
PILLOW, THOMAS;
HOWARD, PHILIP WILSON y
MASTERSON, LUKE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 556 584 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

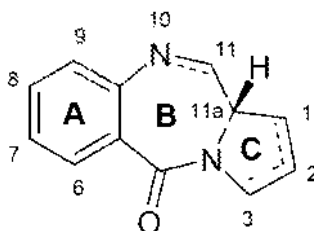
Pirrolobenzodiazepinas y conjugados de las mismas

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBDs), en particular pirrolobenzodiazepinas que tienen un grupo protector lábil N10, en la forma de un conector a un agente de unión celular.

Antecedentes de la invención

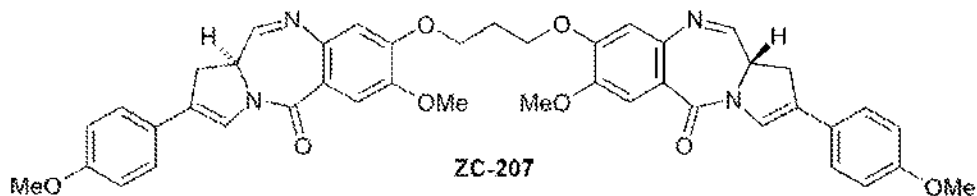
10 *Pirrolobenzodiazepinas*

Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBDs) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGPu. El primer antibiótico antitumoral PBD, antramycin, fue descubierto en 1965 (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha reportado una serie de PBDs de origen natural, y se han desarrollado más de 10 rutas de síntesis para varios análogos (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Los miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 45-148 (1987)), quicamicina (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Patente japonesa 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetaramicina (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102)(Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Las PBDs tienen la estructura general:



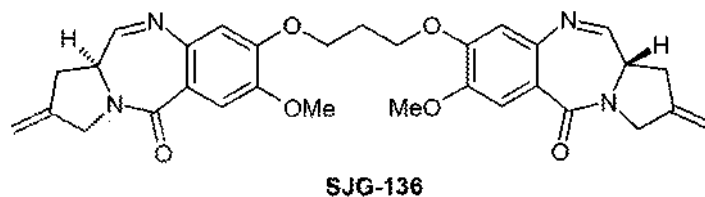
Difieren en el número, tipo y posición de sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en sus anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B existe ya sea una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un éster metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de la alquilación de ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11a quiral que les proporciona un giro hacia la derecha cuando se observa desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN en forma B, conduciendo a un encaje ajustado en el sitio de unión (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad de formar un aducto en el surco menor, les permite interferir con el procesamiento del ADN, y por lo tanto su uso como agentes antitumorales.

Los presentes inventores han descrito anteriormente en el documento WO 2005/085251, compuestos de PBD diméricas que llevan sustituyentes arilo en C2, tales como:

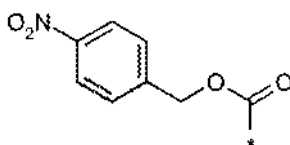


40 Estos compuestos han demostrado ser agentes citotóxicos altamente útiles.

45 Un compuesto de pirrolobenzodiazepina particularmente ventajoso es descrito por Gregson et al., (Chem. Commun, 1999, 797-798) como el compuesto **1**, y por Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) como el compuesto **4a**. Este compuesto, también conocido como SJG-136, se muestra a continuación:



5 Los presentes inventores han descrito anteriormente que los compuestos de PBD pueden emplearse como profármacos mediante la protección de los mismos en la posición N10 con un grupo protector de nitrógeno que es retirable *in vivo* (documento WO 00/12507). Muchos de estos grupos protectores son carbamatos, y tienen, por ejemplo, la estructura:



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

10 Los presentes inventores también han descrito la preparación de compuestos de PBD que tienen un grupo protector de nitrógeno de base carbamato en la posición N10 (documento WO 2005/023814). Los grupos protectores son removibles de la posición N10 de la porción de PBD para dejar un enlace imina N10-C11. Varios grupos protectores se describe, incluyendo grupos que pueden escindirse mediante la acción de enzimas.

15 El documento WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos dímeros de PBD que tienen grupos de enlace para la conexión a un agente de unión celular, tal como un anticuerpo. El enlazador está presente en el puente que une las unidades de PBD monoméricas del dímero.

Conjugados anticuerpo-fármaco

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

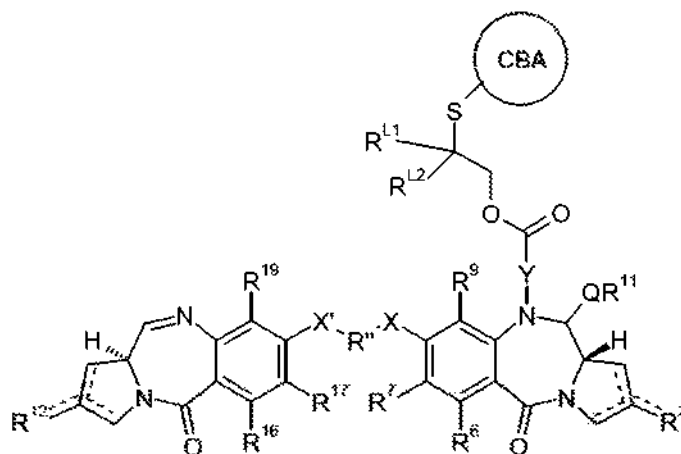
35 Se busca con ello la eficacia máxima con un mínimo de toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y perfeccionar los ADC se han centrado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAbs), así como en el mecanismo de acción del fármaco, el enlace al fármaco, la relación fármaco/anticuerpo (carga), y las propiedades de liberación del fármaco (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):9:25-932; Doman et al (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 et al (2006) Bioconj. Chem. 17:114-124; Erickson et al (2006) Cancer Res. 66(6): 1-8; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11 ;843-852; Jeffrey et al (2005) J. Med. Chem. 48:1344-1358; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070). Los restos de fármaco pueden impartir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN, o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan a anticuerpos grandes o a ligandos de receptores de proteínas.

45 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo enfoque para la formación de conjugados de PBD con agentes de unión celular, y en particular, los conjugados anticuerpo-PBD.

Sumario de la invención

50 En un aspecto general, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto dímero de PBD conectado a través de la posición N10 por medio de un enlazador de azufre específico a un agente de unión celular. El agente de unión celular es preferiblemente un anticuerpo.

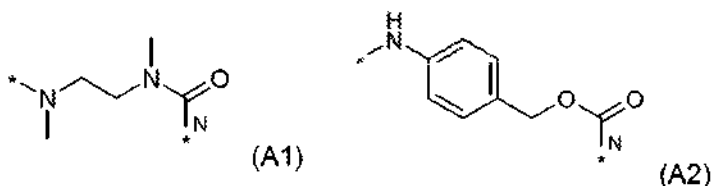
En un primer aspecto, la presente invención proporciona nuevos compuestos conjugados de fórmula (A):



A

y sales y solvatos de los mismos, en la que:

- 5 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 de halo o dihalo;
 en donde R^D se selecciona independientemente entre R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H, y halo;
 10 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;
 Y se entre un enlace sencillo, y un grupo de las fórmulas A1 o A2:

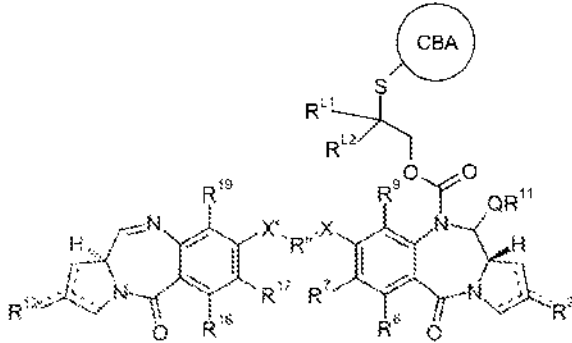
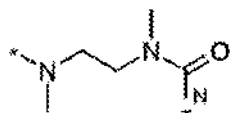
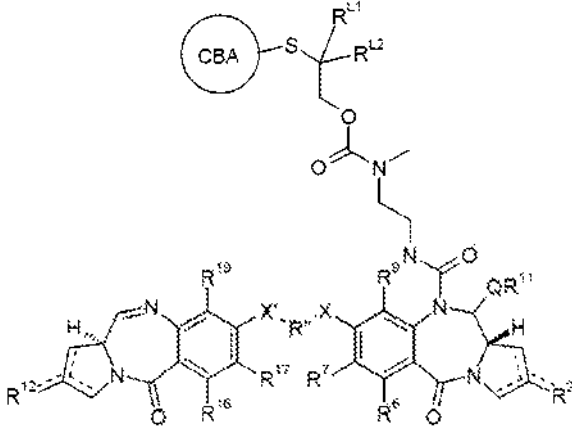
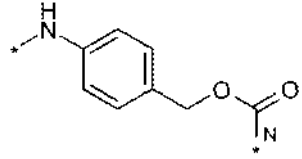
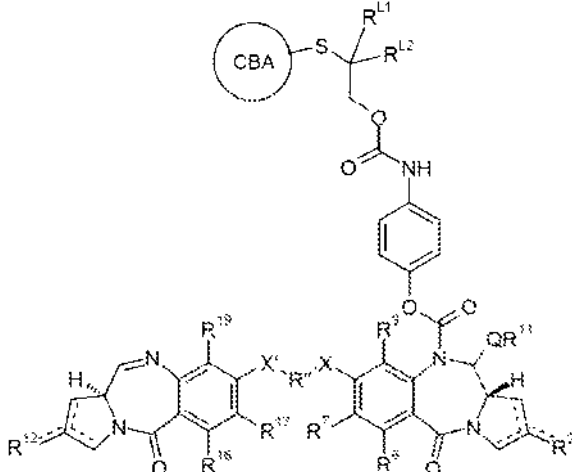


en donde N muestra donde se une el grupo a la N10 de la porción PBD;

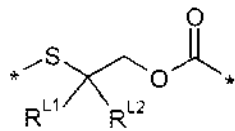
- 15 R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente entre H y metilo, o junto con el átomo de carbono al cual están unidos
 forman un grupo ciclopropileno;
 CBA representa un agente de unión celular;
 Q se selecciona independientemente de O, S y NH;
 R^{11} es H, o R o, en donde Q es O, SO₃M, en donde M es un catión metálico;
 R y R' se seleccionan cada uno independientemente entre grupos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, y
 20 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 o 7 miembros; en donde R^{12} , R^{16} , R^{18} y R^{17} son como se
 definen para R^2 , R^6 , R^9 y R^7 , respectivamente;
 en donde R'' es un grupo alquileo C₃₋₁₂, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por
 25 ejemplo, O, S, N(H), NMe y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridinina, cuyos anillos están
 opcionalmente sustituidos;
 X y X' se seleccionan independientemente entre O, S y N(H).

Por tanto, la fórmula A se selecciona entre las siguientes fórmulas A-I, A-II y A-III, dependiendo de Y:

30

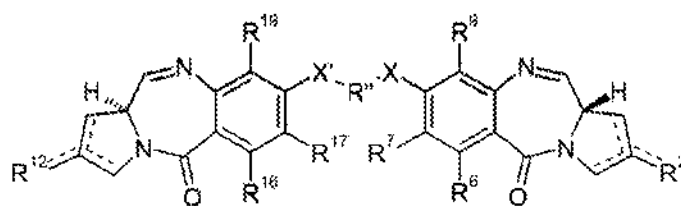
Y	A
<p>Enlace sencillo</p>	 <p style="text-align: center;">A-I</p>
 <p style="text-align: right;">(A1)</p>	 <p style="text-align: center;">A-II</p>
 <p style="text-align: right;">(A2)</p>	 <p style="text-align: center;">A-III</p>

En los compuestos de fórmula A:

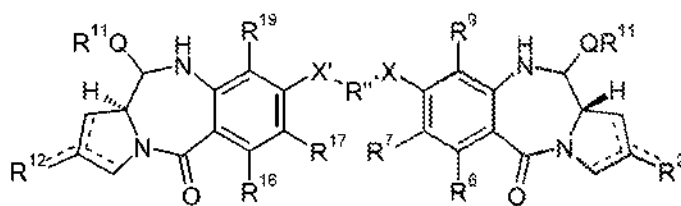


5 es el grupo enlazador de azufre.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un conjugado del primer aspecto para proporcionar un compuesto de fórmula (B) o (C) en una ubicación objetivo:



B



C

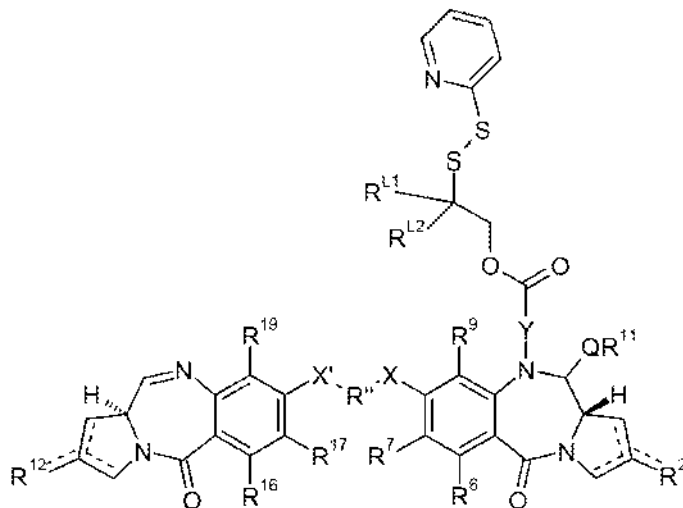
y sales y solvatos de los mismos, en donde los grupos son como para el primer aspecto, excepto porque

5

Q se selecciona independientemente de O, S y NH; y
R¹¹ es H, o R o, en donde Q es O, SO₃M, en donde M es un catión metálico.

Un tercer aspecto de la presente invención también proporciona compuestos de fórmula (D) para usarse en la preparación de los compuestos conjugados de la invención:

10



D

y sales y solvatos de los mismos, en donde los grupos son como se han definido en el primer aspecto de la invención.

Descripción detallada de la invención

15

La presente invención proporciona un conjugado que comprende un dímero de PBD conectado a través de la posición N10 en una de las porciones de PBD por medio del enlazador especificado a un agente de unión celular.

20

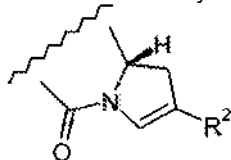
La presente invención es adecuada para usarse en proporcionar un compuesto de PBD a un sitio preferido en un sujeto. El conjugado permite la liberación de un compuesto activo de PBD que no retiene ninguna parte del enlazador. No hay ningún extremo saliente presente que pudiera afectar a la reactividad del compuesto de PBD.

Preferencias

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención tal como se ha descrito anteriormente, o pueden referirse a un solo aspecto. Las preferencias se pueden combinar conjuntamente en cualquier combinación.

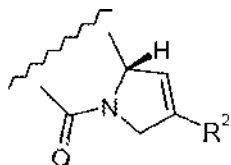
Doble enlace

En una realización, no hay ningún doble enlace presente entre C1 y C2, ni C2 y C3. 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.

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

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 selecciona adicionalmente de 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.

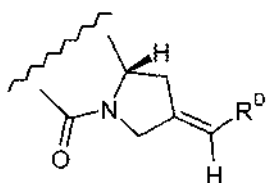
En una realización, R² se selecciona independientemente entre H, =O =CH₂, R, =CH-R^D, y =C(R^D)₂.

En una realización, R² es independientemente H.

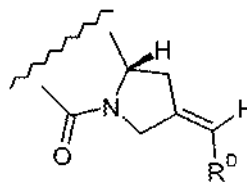
En una realización, R² es independientemente =O.

En una realización, R² es independientemente =CH₂.

En una realización, R² es independientemente =CH-R^D. Dentro del compuesto de PBD, el grupo =CH-R^D puede tener cualquiera de las configuraciones mostradas a continuación:



(I)



(II)

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

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

En una realización, R² es independientemente =CF₂.

En una realización, R² es independientemente R.

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

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

5 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.

10 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 tienilo opcionalmente sustituido.

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

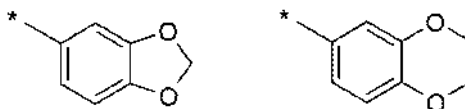
En una realización, R^2 es independientemente piridilo opcionalmente sustituido.

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

En una realización, R^2 porta de uno a tres grupos sustituyentes, siendo más preferidos 1 y 2, y siendo los más preferidos grupos individualmente sustituidos. Los sustituyentes pueden estar en cualquier posición.

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

En una realización, R^2 se selecciona entre:



30 en las que el asterisco indica el punto de unión.

35 Cuando R^7 es un grupo arilo C_{8-10} , por ejemplo quinolinilo o isoquinolinilo, este puede portar cualquier número de sustituyentes en cualquier posición de los anillos quinolina o isoquinolina. En algunas realizaciones, este porta uno, dos o tres sustituyentes, y estos pueden estar en cualquiera de los anillos proximal y distal o ambos (si hay más de un sustituyente).

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

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

Halo, Hidroxilo, Éter, Formilo, Acilo, Carboxi, Éster, Aciloxi, Amino, Amido, Acilamido, Aminocarboniloxi, Ureído, Nitro, Ciano y Tioéter.

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

50 Cuando R^2 es alquilo C_{1-12} , el sustituyente opcional puede incluir adicionalmente grupos heterociclilo C_{3-20} y arilo C_{6-20} .

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

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

60 Se entiende que el término "alquilo" abarca las sub-clases alquenoilo y alquinoilo, 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 de C_{1-12} opcionalmente sustituido contiene por lo 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 de C_{1-12} es un grupo seleccionado de alquilo de C_{1-12} , alquenoilo C_{2-12} , alquinoilo C_{2-12} y cicloalquilo C_{3-12} .

Si un sustituyente en R^2 es halo, este es preferiblemente F o Cl, más preferiblemente F.

Si un sustituyente en R^2 es éter, este puede ser en algunas realizaciones un grupo alcoxi, por ejemplo, un grupo alcoxi C_{1-7} (por ejemplo, metoxi, etoxi) o este puede ser en algunas realizaciones un grupo ariloxi C_{5-7} (por ejemplo, fenoxi, piridiloxi, furaniloxi).

Si un sustituyente en R^2 es alquilo C_{1-7} , este puede ser preferentemente un grupo alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo).

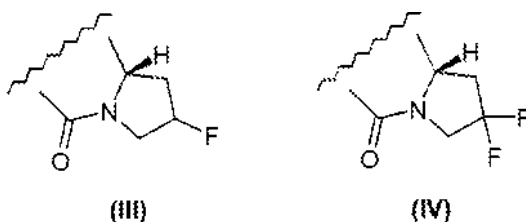
Si un sustituyente en R^2 es heterociclilo C_{3-7} , este puede ser en algunas realizaciones un grupo heterociclilo C_6 que contiene nitrógeno, por ejemplo, morfolino, tiomorfolino, piperidinilo, piperazinilo. Estos grupos pueden estar unidos al resto de la porción de PSD por medio del átomo de nitrógeno. Estos grupos pueden estar adicionalmente sustituidos, por ejemplo, con grupos alquilo C_{1-4} .

Si un sustituyente en R^2 es bis-oxi-alquileo C_{1-3} , este es preferiblemente bis-oxi-metileno o bis-oxietileno.

Los sustituyentes particularmente preferidos para R^2 incluyen metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metil-tienilo.

Los grupos R^2 sustituidos particularmente preferidos incluyen, 4-metoxi-fenilo, 3-metoxifenilo, 4-etoxi-fenilo, 3-etoxi-fenilo, 4-metil-fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 3,4-bisoximetilen-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, R^2 es halo o dihalo. En una realización, R^2 es -F o -F₂, sustituyentes que se ilustran a continuación como (III) y (IV) respectivamente:



En algunas realizaciones, se prefiere que haya un doble enlace entre C2 y C3 o que el sustituyente C2 esté enlazado al anillo de PBD mediante un doble enlace (es decir, que el átomo de C en C2 sea un centro de sp^2)

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.

R^6

En una realización, R^6 se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn- y Halo.

En una realización, R^6 se selecciona independientemente entre H, OH, OR, SH, NH₂, NO₂ y Halo.

En una realización, R^6 se selecciona independientemente entre H y Halo.

En una realización, R^6 es independientemente H.

En una realización, R^6 y R^7 forman juntos un grupo -O-(CH₂)_p-O-, donde p es 1 o 2.

R^7

R^7 se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn y halo.

En una realización, R^7 es independientemente OR.

En una realización, R^7 es independientemente OR^{7A} , cuando R^{7A} es independientemente alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido.

En una realización, R^{7A} es independientemente alquilo C_{1-6} saturado opcionalmente sustituido.

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

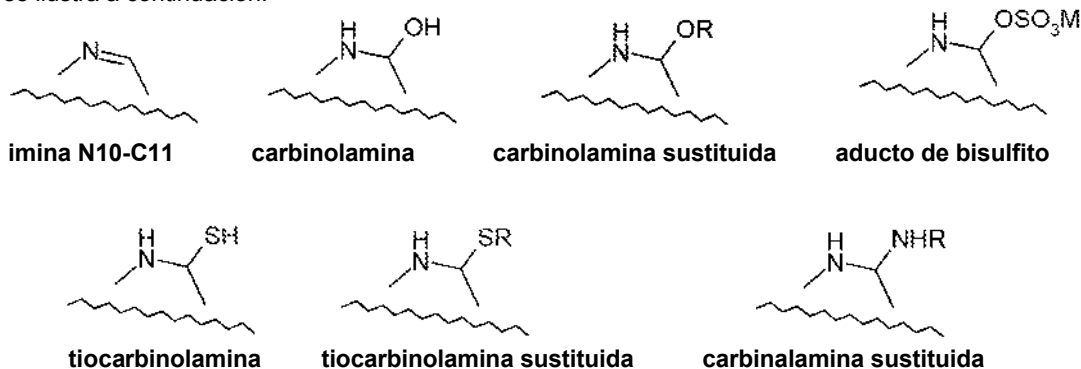
En una realización, R^9 se selecciona independientemente entre H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , NO_2 , Me_3Sn - y Halo.

En una realización, R^9 es independientemente H.

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

Grupo enlazador

El grupo enlazador es retirable de la posición N10 del resto de PBD en el conjugado de fórmula A para dejar un enlace imina N10-C11, una carbinolamina, una carbinolamina sustituida, en donde QR^{11} es OSO_3M , un aducto de bisulfito, una tiocarbinolamina, una tiocarbinolamina sustituida, o una carbinalamina sustituida (compuesto de las fórmulas B o C) como se ilustra a continuación:



donde R y M son como se han definido para los conjugados de la invención.

En una realización, el grupo enlazador es retirable de la posición N10 del resto de PBD para dejar un enlace imina N10-C11.

El enlace especificado entre el dímero de PBD y el agente de unión celular, por ejemplo, anticuerpo, en la presente invención es preferiblemente estable extracelularmente. Antes del transporte o suministro en una célula, el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es preferiblemente estable y permanece intacto, es decir, el anticuerpo permanece enlazado a la porción de fármaco. Los enlazadores son estables fuera de la célula diana y pueden ser escindidos a cierto grado eficaz dentro de la célula. Un enlazador eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específicas del anticuerpo; (ii) permitirá el suministro intracelular del conjugado o porción de fármaco; (iii) permanecerá estable e intacto, es decir, sin escindir, hasta que el conjugado se ha suministrado o transportado a su sitio objetivo; y (iv) mantendrá un efecto de destrucción celular, citotóxico o un efecto citostático de la porción de fármaco PBD. La estabilidad del ADC se puede medir mediante técnicas analíticas estándar tales como espectroscopía de masas, HPLC y la técnica de separación/análisis LC/MS.

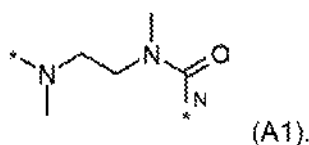
El suministro de los compuestos de las fórmulas B o C se consigue en el sitio de activación deseado de los conjugados de fórmula A mediante la acción de una enzima en el grupo enlazador. El S del conjugado de fórmula A está enlazado mediante un enlace disulfuro a un S libre (tiol activo) en el agente de unión celular.

El grupo enlazador puede ser escindible mediante la acción de una enzima. En una realización, la enzima es una tioreductasa.

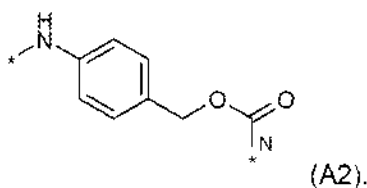
Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazantes mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitolo). Cada puente de cisteína formará entonces, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro, o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña ingeniería de anticuerpos mediante la introducción de aminoácidos cisteína reactivos. R^{L1} y R^{L2} se seleccionan entre H y metilo, o junto con el átomo de carbono al cual están unidos forman un grupo ciclopropileno. En algunas realizaciones, ambos son H. En otra realización, son ambos metilo. En realizaciones adicionales, uno es H y el otro es metilo; en estas realizaciones, el átomo de carbono al que están enlazados es un centros quiral.

En algunas realizaciones, Y es un enlace sencillo.

En otras realizaciones, Y es



En realizaciones adicionales, Y es



Q

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

Preferiblemente, Q es O.

R^{11}

En una realización, R^{11} es H, o R o, en donde Q es O, SO_3M , en donde M es un catión metálico.

En una realización, R^{11} es H.

En una realización, R^{11} es R.

En una realización, en donde Q es O, R^{11} es SO_3M , en donde M es un catión metálico. El catión puede ser Na^+ .

Agente de unión celular

Un agente de unión celular puede ser de cualquier tipo, e incluyen péptidos y no péptidos. Estos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene por lo menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes, o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos bispecíficos), y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivadas de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune 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, Nueva York). Un antígeno objetivo generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados EPítomos, reconocidos por las CDRs en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un EPítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo 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 inmuno-específicamente a un antígeno de un blanco de interés o parte del mismo, tales blancos incluyendo pero no limitados a, células cancerígenas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociadas a una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie, incluyendo seres humanos, ratones, o conejo.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los 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 anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad), y fragmentos de unión al EPítopo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a los antígenos de células cancerígenas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son elevadamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que pueden ser sintetizados sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (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 secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo o simio) y secuencias de región constante de humano.

Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende dominios VL y VH, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa de humano) o variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras" las cuales se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de la variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen unión de C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación a la baja de receptores sobre la superficie celular tales como el receptor de células B y BCR.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases" Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en "subclases" (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Los ejemplos de agentes de unión celular incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

El agente de unión celular puede ser, o comprender, un polipéptido. El polipéptido puede ser un polipéptido cíclico. El agente de unión celular puede ser un anticuerpo. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un con un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

Carga de fármacos

La carga de fármacos es el número promedio de fármacos de PBD por anticuerpo. La carga de fármacos puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo (Ab), es decir, en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 porciones de fármaco se unen covalentemente al anticuerpo. Las composiciones de ADC incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, electroforesis, y HPLC. La distribución cuantitativa de los ADC en términos de p también se puede determinar. Mediante ELISA, se puede determinar el valor promedio de p en una preparación particular de ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores p (fármaco) no es perceptible por la unión antígeno-anticuerpo y la limitación de detección de ELISA. Asimismo, el ensayo ELISA para la detección de conjugados anticuerpo-fármaco determina donde las porciones de fármaco están unidas al anticuerpo, tales como los fragmentos de cadena pesada o de cadena ligera, o los residuos de aminoácidos particulares. En algunos casos, la separación, la purificación, y la caracterización del ADC homogéneo en donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármacos se pueden conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Para algún conjugado anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de la cisteína, o puede tener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales un enlazador se puede unir. Una carga de fármacos mayor, por ejemplo, $p > 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco.

Normalmente, menos de la máxima teórica de porciones de fármaco se conjugan a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el intermediario fármaco-enlazador (D-L) o reactivo enlazador. Solamente los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador de amina reactiva. Asimismo, solamente los grupos tiol de la cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador de tiol reactivo. En general, los anticuerpos no contienen muchos, o ningún, grupos tiol de la cisteína libres y reactivos que se puedan enlazar a una porción de fármaco. La mayoría de los residuos tiol de la cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes disulfuro y se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar del intermediario fármaco-enlazador (D-L) o reactivo enlazador en relación con el anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de reacción de conjugación, y (iii) parcializar o limitar las condiciones reductoras para la modificación de tiol de la cisteína.

Los aminoácidos cisteína se pueden producir mediante ingeniería genética en sitios reactivos en un anticuerpo y los cuales no forman enlaces disulfuro intercatenarios o intermoleculares (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Doman et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249, Shen et. al. (2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52). Los tioles de la cisteína producidos mediante ingeniería genética pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los intermediarios fármaco-enlazador de la presente invención que tienen grupos electrófilos que son reactivos con tiol tales como maleimida o alfa-halo amidas para formar un ADC con anticuerpos producidos por ingeniería de cisteína (TioMabs) y las porciones de fármaco PBD. La ubicación de la porción de fármaco de esta manera se puede diseñar, controlar, y conocer. La carga de fármacos se puede controlar debido a que los grupos tiol de la cisteína producidos mediante ingeniería genética normalmente reaccionan con reactivos enlazadores que son reactivos con tiol o intermediarios fármaco-enlazador con un alto rendimiento. La producción mediante ingeniería genética de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido cisteína mediante sustitución en un solo sitio en la cadena pesada o ligera da dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Se puede conseguir una carga de fármacos cercana a 2 y cercana a la homogeneidad del ADC producto de conjugación.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermediario fármaco-enlazador, o reactivo enlazador seguido de reactivo de porción de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de porciones de fármaco unidas a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía de líquidos tales como columna polimérica de fase inversa (PLRP) y de interacción hidrofóbica (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla mediante el valor de carga de fármacos. Las preparaciones de ADC con un solo valor de carga de fármacos (p) se pueden aislar, sin embargo, estos ADCs de un solo valor de carga todavía pueden ser mezclas heterogéneas debido a que las porciones de fármaco se pueden unir, por medio del enlazador, en diferentes sitios en el anticuerpo.

De esta manera, las composiciones de conjugado anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos conjugados anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo tiene una o más porciones de fármaco de PBD y en donde las porciones de fármaco se pueden unir al anticuerpo en varios residuos de aminoácidos.

En una realización, el número promedio de grupos dímero de pirrolobenzodiazepina por cada agente de unión celular 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 dímero de pirrolobenzodiazepina por cada agente de unión celular.

5 Péptidos

En una realización, el agente de unión celular es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-20, preferiblemente 6-20, residuos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión celular esté enlazado con un monómero o compuesto dímero de pirrolobenzodiazepina.

10 El agente de unión celular comprende un péptido que se une a la integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ sobre XYS.

15 En una realización, el agente de unión celular comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Como alternativa, una variante de la secuencia de A20FMDV-Cys se puede utilizar en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos se sustituyen con otro residuo de aminoácido.

20 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; anticuerpo quimérico; anticuerpo humanizado; anticuerpo totalmente humano; o un anticuerpo de una sola cadena. En una realización, el anticuerpo es un fragmento de uno de estos anticuerpos que tienen actividad biológica. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

25 En estas realizaciones, cada anticuerpo puede estar enlazado a uno o varios grupos dímero de pirrolobenzodiazepina. Las relaciones preferidas de pirrolobenzodiazepina al agente de unión celular se han dado anteriormente.

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

30 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen aquellos anticuerpos descritos en el documento WO 2005/082023. Particularmente preferidos son aquellos anticuerpos para antígenos asociados a tumores. Los ejemplos de los antígenos conocidos en la técnica incluyen aquellos antígenos asociados a tumores establecidos en el documento WO 2005/082023. Véase, por ejemplo, páginas 41-55.

35 Los conjugados de la invención están diseñados para dirigirse a células tumorales por medio de sus antígenos de superficie celular. Los antígenos son habitualmente antígenos de superficie celular normales que son ya sea sobre-expresados o expresado en un número de veces anormal. Idealmente, el antígeno diana se expresa solamente en células proliferativas (preferiblemente células tumorales), esto se observa raramente en la práctica. Como resultado, los antígenos diana usualmente se seleccionan con base en la expresión diferencial entre tejido proliferativo y sano.

45 Los anticuerpos se han planteado para dirigirse a antígenos específicos relacionados con tumores incluyendo: Cripto, CD30, CD19, CD33, Glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD22 (Siglec2), CD33 (Siglec3), CD79, CD138, PSCA, PSMA (antígeno prostático específico de membrana), BCMA, CD20, CD70, E-selectina, EphB2, Melanotransferina, Muc16 y TMEFF2.

50 Los antígenos asociados a tumores (TAA) son conocidos en la técnica, y se pueden preparar para su uso en la generación de anticuerpos utilizando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. En 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 a tumores que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipo(s) particular(es) de células cancerígenas en comparación con una o más célula(s) normal(es) no cancerígena(s). A menudo, tales polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerígenas en comparación con la superficie de las células no cancerígenas. La identificación de tales polipéptidos del antígenos sobre la superficie celular asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a células cancerígenas para la destrucción por medio de terapias basadas en anticuerpos.

55 Los ejemplos de TAA incluyen, TAA (1)-(36) enlistados a continuación. Por conveniencia, la información relativa a estos antígenos, todos los cuales son conocidos en la técnica, se enlistan a continuación e incluyen nombres, nombres alternativos, números de acceso a GenBank y referencia(s) primaria(s), seguido de las convenciones de identificación de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas correspondientes a TAA (1)-(36) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumores dirigidos por anticuerpos incluyen todas las variantes de la secuencia de aminoácidos e isoformas que poseen por lo menos aproximadamente 70 %, 80 %, 85 %, 60 90 %, o 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades biológicas o características que un TAA que tiene una secuencia 65

encontrada en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una secuencia variante generalmente es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia correspondiente enlistada.

5 ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (1)-(36):

(1) BMPR1B (receptor tipo IB de 10 dominios de proteína morfogenética ósea, acceso a GenBank n.º NM_001203) Dijke, P., et al Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997); documento WO2004/063362 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (Página 38-39); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003/055443 (Página 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; Páginas 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 WO2001/46204 (Ejemplo ; Fig 4); NP_001194 receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo IB/pid=NP_001194.1. Referencias cruzadas. MIM:603248; NP_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, acceso a GenBank no. NM_003486) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gauguitsch, H.W., et al (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; Páginas 127-129); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Página 222, 393); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Páginas 93-95); documento WO2000/14228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); documento US2003/224454 (Fig 3); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 150); familia portadora de soluto 7 NP_003477 (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 (antígeno epitelial de transmembrana de seis hélices de la próstata, acceso a GenBank no. NM_012449); Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96 (25):14523-14528; documento WO2004/065577 (Reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Fig 1L); documento 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; Páginas 618-619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig 2A); antígeno EPitelial de transmembrana de seis hélices de próstata NP_036581; Referencias cruzadas; MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

(4) 0772P (CA125, MUC16, acceso a GenBank no. 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; Páginas 116-121); documento US2003/124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas; GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, acceso a GenBank n.º NM_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995); documento WO2003/101283 (Reivindicación 14); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Páginas 287-288); documento WO2002/101075 (Reivindicación 4; Páginas 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, NPTIIB, SLC34A2, familia portadora de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio tipo II, acceso a GenBank no. NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (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; Páginas 17-19); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2001/75177 (Reivindicación 24; Páginas 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 a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B, acceso a GenBank no. AB040878); Nagase T., et al (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, 8-58); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Acceso:

Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC: 10737

(8) PSCA hlg (genes 2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN DNA 2700050C12, acceso a GenBank n.º AY358628); Ross et al (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

(9) ETBR (Receptor de endotelina tipo B, acceso a GenBank n.º AY275463); Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al *Biochem Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., et al *JPN. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., et al *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004/045516 (Reivindicación 1); documento WO2004/048936 (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; Páginas 124-125); documento EP0522868 (Reivindicación 8; Fig 2); documento WO2001/77172 (Reivindicación 1; Páginas 297-299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Fig 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004/001004

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, acceso a GenBank n.º 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_C17763_1

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado a cáncer de próstata, proteína 1 asociada a cáncer de próstata, antígeno epitelial de transmembrana de seis hélices de próstata 2, proteína de transmembrana de seis hélices de próstata, acceso a GenBank n.º AF455138); *Lab. Invest.* 82 (11); 1573-1582 (2002); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (Reivindicación 1; Fig 1); documento WO2002/72596 (Reivindicación 13; Páginas 54-55); documento WO2001/72962 (Reivindicación 1; Fig 4 B); 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

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, acceso a GenBank n.º NM_017636); Xu, X.Z., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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; Páginas 100-103); documento WO2002/10382 (Reivindicación 1; Fig 9 A); 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

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, Acceso a GenBank n.º NP_003203 o NM_003212); Ciccociola, A., et al *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; Páginas 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

(14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus Epstein-Barr) o Hs.73792 acceso a GenBank n.º M26004); Fujisaku et al (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84, 9194-9198, 1987; Bare! M., et al *Mol. Immunol.*

- 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (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); Aceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.
- (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (inmunoglobulina-beta asociada), B29, acceso a GenBank n.º NM_000626 o 11038674); Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (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); US5644033; documento WO2003/048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); documento WO 99/58658, documento US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); documento WO2000/55351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM,147245; NP_000517.1; NM_000626_1
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (Proteína 1a de anclaje de la fosfatasa que contiene el dominio SH2) SPAP1B, SPAP1C, acceso a GenBank n.º NM_030764, AY258130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sel. EE.UU. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (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, acceso a GenBank n.º Me11730); Coussens L., et al Science (1985) 230(4730): 1132-1133); Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol, 165, 869-880, 200A; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al Nature 421,756-760, 2003; Ehsani A., et al (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; Páginas 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; Páginas 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; Páginas 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig 4); Aceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1
- (18) NCA (CEACAM6, acceso a GenBank n.º M18728); Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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); Aceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728
- (19) MDP (DPEP1, acceso a GenBank n.º BC017023); Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (26):16899-16903 (2002); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33: Páginas 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, acceso a GenBank n.º AF184971); Clerk H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al Nature 425, 805-811,2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (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; Páginas 55-59); Aceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.
- (21) Brevican (BCAN, BEHAB, acceso a GenBank n.º AF229053); Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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, acceso a GenBank n.º NM_04442); 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 WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Página 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

15 (23) ASLG659 (B7h, acceso a GenBank n.º 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 54; Páginas 45-46); documento WO2002/06317 (Ejemplo 2; Página 320-321, Reivindicación 34; Páginas 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; Páginas 205-207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (Página 233-234, 452-453); WO 01/16318

25 (24) PSCA (Precursor de antígeno de células madre prostáticas, acceso a GenBank n.º AJ297436); Reiter R.E., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; documento WO2004/022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/018553 (Reivindicación 17); documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento 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 1 B); Acceso: O43653; EMBL, AF043498; AAC39607.1

35 (25) GEDA (Acceso a GenBank n.º AY260763); proteína similar a lipoma HMGIC fusion partner 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, BLyS receptor 3, BR3, acceso a GenBank n.º AF116456); receptor BAFF/pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004/058309; documento WO2004/011611; documento WO2003/045422 (Ejemplo ; Páginas 32-33); documento WO2003/014294 (Reivindicación 35; Fig 6 B); documento WO2003/035846 (Reivindicación 70; Páginas 615-616); documento WO2002/94852 (Col 136-137); documento WO2002/38766 (Reivindicación 3; Página 133); documento WO2002/24909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

50 (27) CD22 (Isoforma CD22-B del receptor de células B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, acceso a GenBank n.º AK026467); Wilson et al (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146; documento WO2003/072036 (Reivindicación 1; Fig 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

55 (28) CD79a (CD79A, CD79 α , inmunoglobulina-alfa asociada, una proteína específica para células B que interactúa de forma covalente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo en la superficie con moléculas Ig M, transduce una señal implicada en la diferenciación de células B), pl: 4,84, PM: 25028 TM: 2 [P] Gene Chromosome: 19q 13.2, acceso a GenBank n.º 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); US5644033; Ha et al (1992) *J. Immunol.* 148(5): 1526-1531; Müller et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146; Yu et al (1992) *J. Immunol.* 148(2) 633-637; Sakaguchi et al (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464

60 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteínas G que es activado por la quimiquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y defensa humoral, juega un papel en la infección por VIH-2 y tal vez en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia); 372 aa, pl: 8,54 PM: 41959 TM: 7 [P] Gene Chromosome: 11q23.3, acceso a GenBank n.º 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

65

(página 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 (página 56-58); documento WO92/17497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC clase II (antígeno Ia) que se une a los péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pi: 6,56, PM: 30820.TM: 1 [P] Gene Chromosome: 6p21.3, acceso a GenBank n.º NP_002111.1); Tonnellet et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; documento WO99/58658 (reivindicación 13, Fig 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119

(31) P2X5 (Ligando del receptor purinérgico P2X- canal iónico 5 cerrado, un canal iónico cerrado por el ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa, pl: 7,63, PM: 47206 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 17p13.3, acceso a GenBank n.º NP_002552.2); Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (reivindicación 10); Touchman et al (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)

(32) CD72 (Antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, PM: 40225, TM: 1 [P] Gene Chromosome: 9p13.3, acceso a GenBank n.º NP_001773.1); documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2000/026493 (páginas 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (página 105-106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

(33) LY64 (Antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de células B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada al aumento de actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6,20, PM: 74147 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 5q12, acceso a GenBank n.º NP_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento WO2000/12130 (página 24-26)

(34) FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios similares a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pl: 5,28, PM: 46925 TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21-1q22, acceso a GenBank n.º NP_443170.1); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003/089624 (reivindicación 7)

(35) IRTA2 (Translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociada 2, un inmunoreceptor putativo con posibles funciones en el desarrollo de las células B y linfomagénesis; la desregulación del gen por la translocación se produce en algunas malignidades de células B); 977 aa, pi: 6,88, PM: 106468, TM: 1 [P] Gene Chromosome: 1q21, acceso a GenBank n.º Humano: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; documento WO2003/024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2)

(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, acceso a NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; acceso a GenBank No. AF179274; AY358907, CAF85723, 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; Horie et al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15: 94(2):178-84.

El anticuerpo de origen también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia del péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis et al. (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 proteínas de fusión con secuencias del ABP enseñadas por: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en

las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en el párrafo [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13.

5 En una realización, el anticuerpo se ha planteado para dirigirse específicamente al tumor relacionado con el antígeno $\alpha\beta_6$.

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

10 *R y R'*

En una realización, R se selecciona independientemente de grupos alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituidos, heterociclilo de C_{3-20} y arilo de C_{5-20} . Estos grupos se definen cada uno en la sección de sustituyentes a continuación.

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

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

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

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

25 Descritas anteriormente en relación con R^2 son varias modalidades relativas a los grupos alquilo y arilo preferidos y la identidad y el número de sustituyentes opcionales. Las preferencias establecidas para R^2 como se aplican a R son aplicables, cuando sea adecuado, a todos los demás grupos R, por ejemplo en donde R^6 , R^7 , R^8 o R^9 es R.

Las preferencias para R también se aplican a R'.

30 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 o 7 miembros. El anillo puede contener un heteroátomo adicional, por ejemplo N, O o S.

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

R''

40 R'' es un grupo alquileo C_{3-12} , 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 piridinina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos.

En una realización, R'' es un grupo alquileo C_{3-12} , cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina.

45 En una realización, el grupo alquileo está opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados de O, S, y NMe y/o anillos aromáticos, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos.

50 En una realización, el anillo aromático es un grupo arileno C_{5-20} , en donde el arileno se refiere a una porción divalente obtenida mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de anillo aromático de un compuesto aromático, cuya porción tiene de 5 a 20 átomos en el anillo.

55 En una realización, R'' es un grupo alquileo C_{3-12} , 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 piridinina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos con NH_2 .

En una realización, R'' es un grupo alquileo C_{3-12} .

En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C_3 , C_5 , C_7 , C_9 y C_{11} .

60 En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C_3 , C_5 y C_7 .

En una realización, R'' se selecciona entre un grupo alquileo C_3 y C_5 .

En una realización, R'' es un grupo alquileo C_3 .

65

En una realización, Rⁿ es un grupo alquileo C₅.

Los grupos alquileo enlistados anteriormente pueden estar opcionalmente interrumpidos por uno o más heteroátomos y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridinina, cuyos anillos están opcionalmente sustituidos.

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

Los grupos alquileo enlistados anteriormente pueden ser grupos alquileo alifáticos lineales no sustituidos.

X

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

Preferiblemente, X es O.

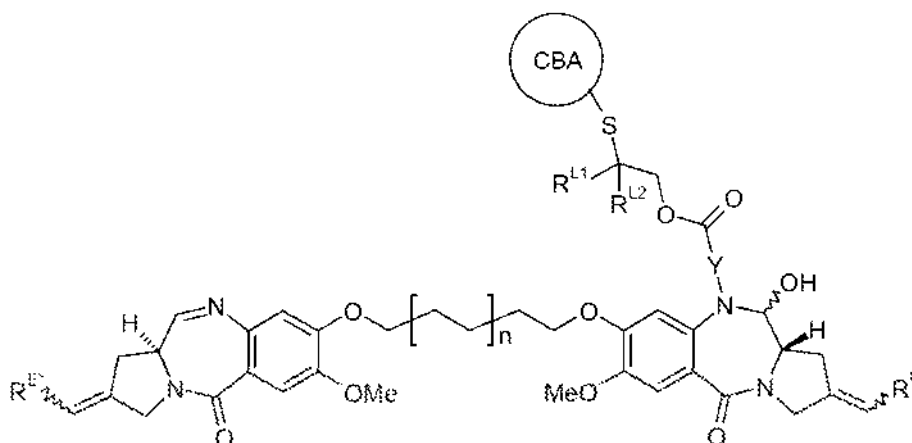
Compuestos preferidos

En una realización, el conjugado es un dímero en donde cada una de las porciones de PBD tiene un grupo metileno C₂, es decir, cada R² es = CH₂. Se prefiere que el agente de unión celular sea un anticuerpo.

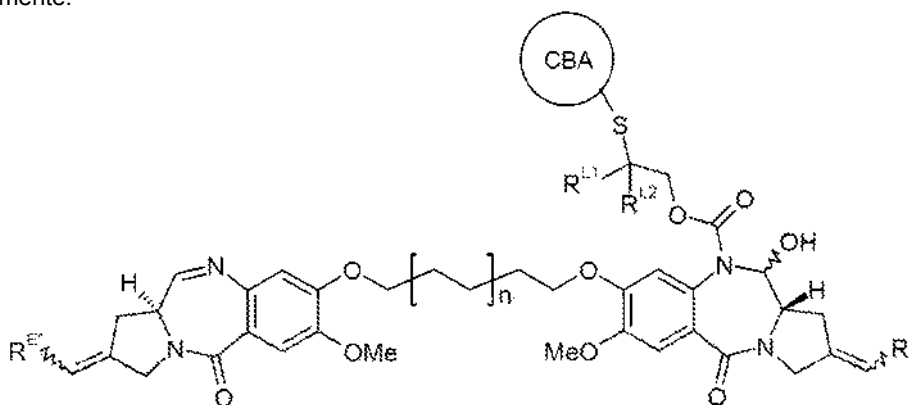
En otra realización, el conjugado es un dímero en donde cada uno de los monómeros tiene un grupo arilo C₂, es decir, cada R² es arilo de C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido, y hay un doble enlace entre C₂ y C₃ en cada porción de PBD. Se prefiere que el agente de unión celular sea un anticuerpo.

Alquileo C₂

En una realización, el conjugado es un compuesto:



y más preferiblemente:

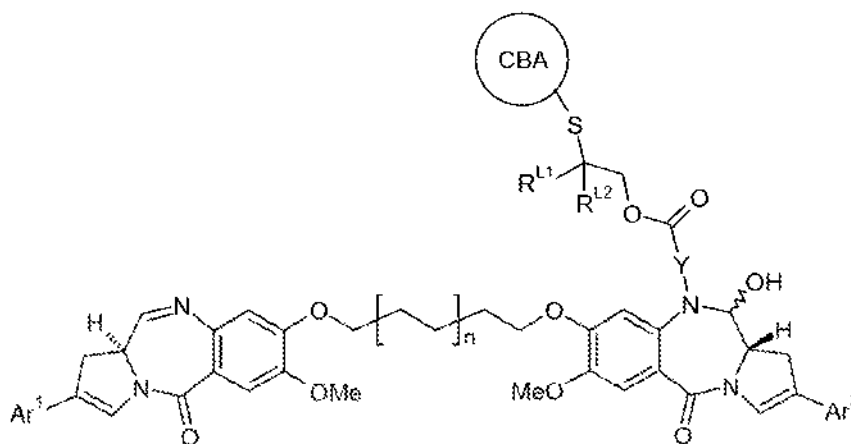


en donde CBA es un agente de unión celular tal como un anticuerpo o un péptido cíclico o lineal, y n es 0 o 1. Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente, y R^E y R^{E'} se seleccionan cada uno independientemente entre H o R^D.

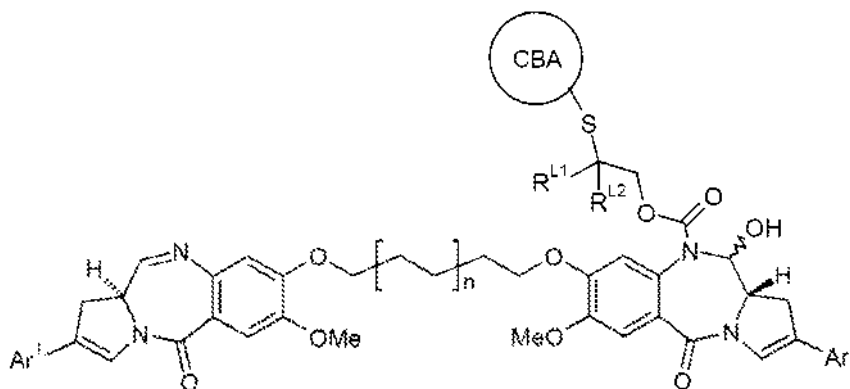
Para cada uno de los compuestos anteriores, pueden aplicarse las siguientes preferencias, cuando sea adecuado:

- n es 0; n es 1;
- R^E es H;
- 5 R^E es R^D, en donde R^D es alquilo opcionalmente sustituido;
- R^E es R^D, en donde R^D es metilo;
- CBA es un anticuerpo;
- CBA es un péptido cíclico;
- 10 R^{L1} y R^{L2} son H;
- R^{L1} y R^{L2} son Me.
- Arilo C2

En una realización, el conjugado es un compuesto:



15 y más preferiblemente:



20 en donde CBA es un agente de unión celular tal como un anticuerpo o un péptido cíclico o lineal, Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente. Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₆₋₂₀ opcionalmente sustituido, y n es 0 o 1, Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes.

25 En una realización, Ar¹ y Ar² en cada una de las realizaciones anteriores se seleccionan cada uno independientemente entre fenilo opcionalmente sustituido, furanilo, tiofenilo y piridilo.

25 En una realización, Ar¹ y Ar² en cada una de las realizaciones anteriores son fenil opcionalmente sustituido.

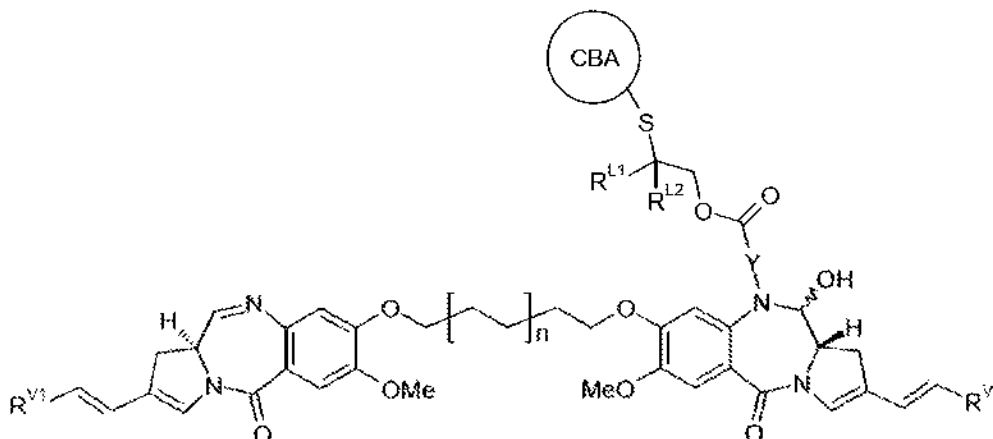
30 En una realización, Ar¹ y Ar² en cada una de las realizaciones anteriores es tien-2-ilo o tien-3-ilo opcionalmente sustituido.

30 En una realización, Ar¹ y Ar² en cada una de las realizaciones anteriores es quinolinilo o isoquinolinilo opcionalmente sustituido.

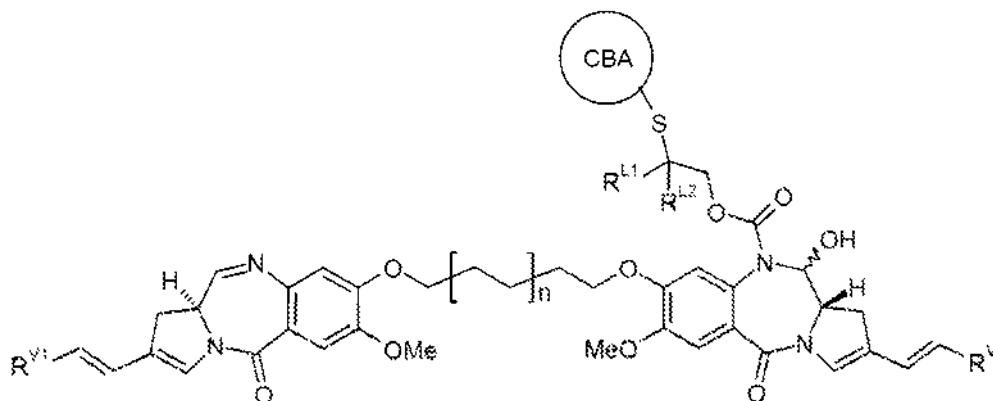
35 El grupo quinolinilo o isoquinolinilo puede estar unido al núcleo de PBD a través de cualquier posición disponible del anillo. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-5-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo y quinolin-8-ilo. De estos, pueden preferirse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

Vinilo C2

En una realización, el conjugado es un compuesto:



5 y más preferiblemente:



10 en donde CBA es un agente de unión celular tal como un anticuerpo o un péptido cíclico o lineal, Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (dicho fenilo puede estar opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C₅₋₆, y n es 0 o 1. R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

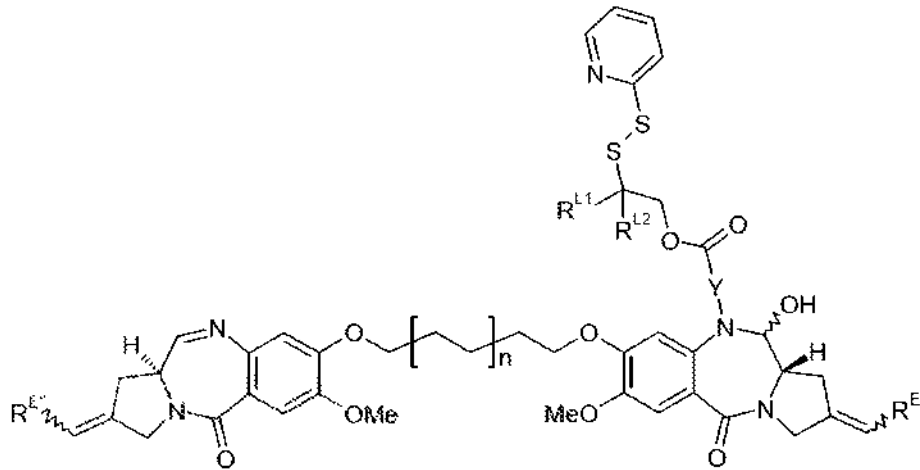
En algunas de las realizaciones anteriores, R^{V1} y R^{V2} puede seleccionarse independientemente entre H, fenilo, y 4-fluorofenilo.

15 *Intermedios preferidos*

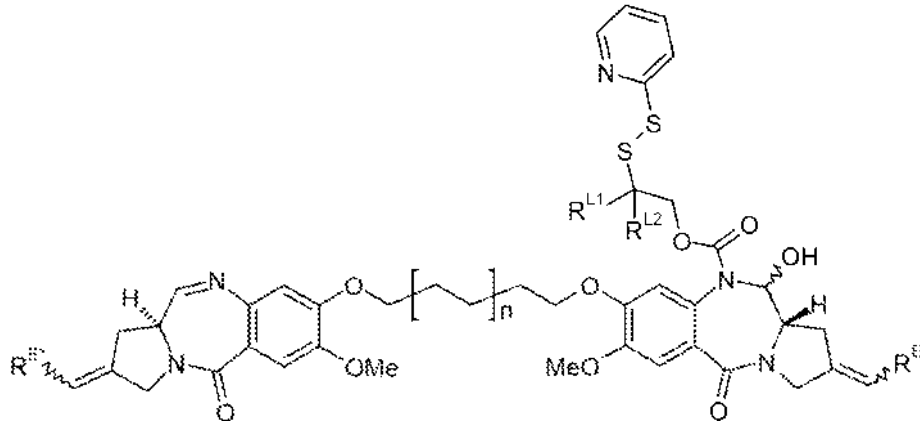
La presente invención proporciona intermediarios para su uso en la preparación de los compuestos conjugados descritos en el presente documento.

20 A continuación se describen intermediarios preferidos, y corresponden estrechamente a los conjugados preferidos descritos anteriormente.

En una realización, el intermediario es un compuesto:

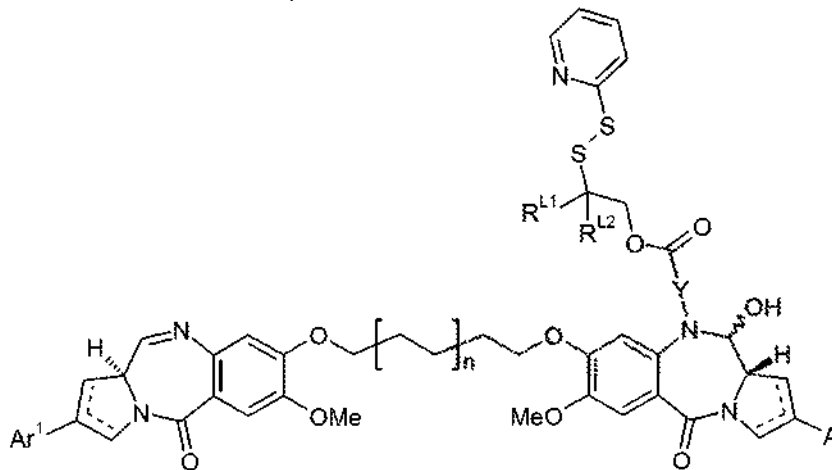


y más preferiblemente:

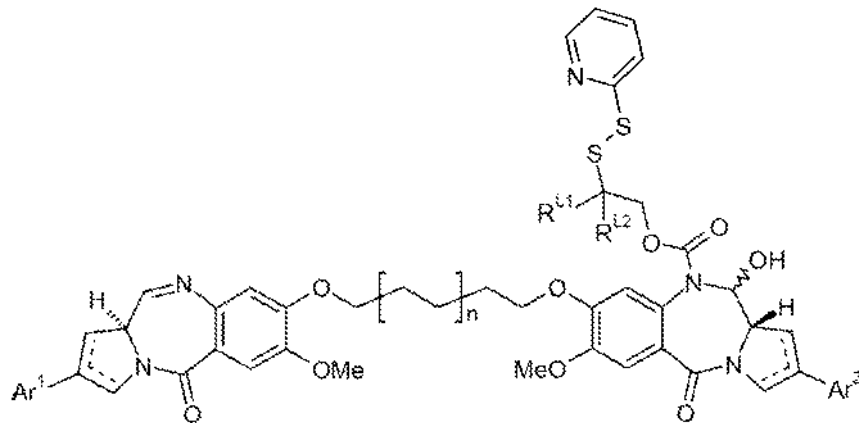


- 5 en donde n es 0 o 1, Y , R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente, y R^E y $R^{E'}$ se seleccionan cada uno independientemente entre H o R^D .

En una realización, el intermediario es un compuesto:



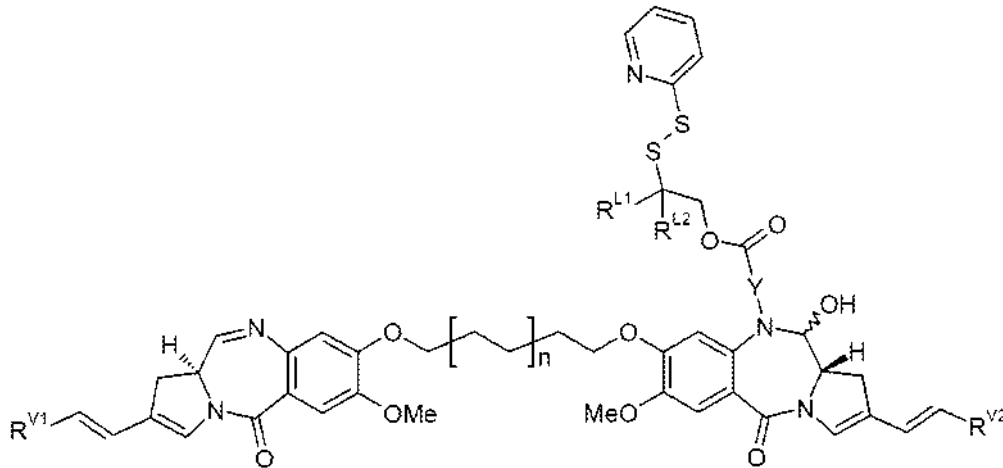
- 10 y más preferiblemente:



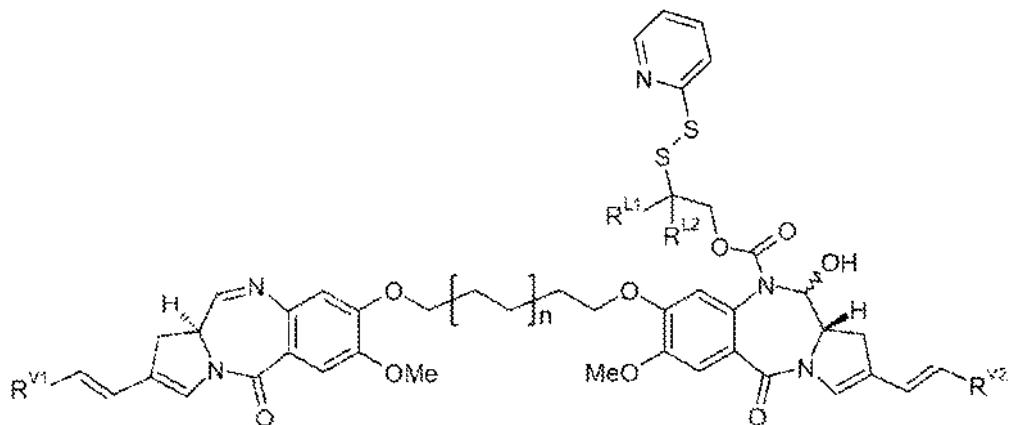
en donde Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente. Ar¹ y Ar² son cada uno independientemente arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituido, y n es 0 o 1. Ar¹ y Ar² pueden ser iguales o diferentes.

5

En una realización, el intermediario es un compuesto:



y más preferiblemente:



10

en donde Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido previamente, R^{V1} y R^{V2} se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo y fenilo (dicho fenilo puede estar opcionalmente sustituido con flúor, particularmente en la posición 4) y heterociclilo C₅₋₆, y n es 0 o 1. R^{V1} y R^{V2} pueden ser iguales o diferentes.

15 *Sustituyentes*

La frase "opcionalmente sustituido" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de origen que puede estar no sustituido o que puede estar sustituido.

A menos que se especifique lo contrario, el término "sustituido" como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de origen que lleva uno o más sustituyentes. El término "sustituyente" se utiliza en el presente documento en el sentido convencional y se refiere a una porción química que está unida covalentemente a, o si es apropiado, fusionada a, un grupo de origen. Una amplia variedad de sustituyentes son bien conocidos, y los métodos para su formación e introducción en varios grupos de origen también son bien conocidos.

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

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

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

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

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

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 o más de los grupos que se enlistan a continuación.

A continuación se describen ejemplos de sustituyentes con más detalle.

Alquilo C₁₋₁₂: La expresión "alquilo C₁₋₁₂" como se usa en el presente documento, se refiere a una porción monovalente obtenida 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, alquinilo, cicloalquilo, etc., descritas más adelante.

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

Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen metilo (C₁), etilo (C₂), n-propilo (C₃), n-butilo (C₄), n-pentilo (amilo) (C₅), n-hexilo (C₆) y n-heptilo (C₇). Los ejemplos de grupos alquilo lineales o ramificados incluyen iso-propilo (C₃), isobutilo (C₄), sec-butilo (C₄), *terc*-butilo (C₄), iso-pentilo (C₅), y neo-pentilo (C₅).

Un grupo alquilo puede estar opcionalmente interrumpido por uno o más heteroátomos seleccionados de O, N(H) y S. Tales grupos puede ser denominados como "heteroalquilo".

Heteroalquilo C₂₋₂₀: La expresión "heteroalquilo C₂₋₁₂" como se usa en el presente documento, se refiere a una porción monovalente obtenida 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, y uno o más heteroátomos seleccionados de O, N(H) y S, preferiblemente O y S.

Los ejemplos de grupos heteroalquilo incluyen, aquellos 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 -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.

Los ejemplos de grupos alquenilo insaturados incluyen, 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.

Los ejemplos de grupos alquínico insaturados incluyen, etínico ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y 2-propínico (propargilo, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$).

5 Cicloalquilo C_{3-12} : La expresión "cicloalquilo C_{3-12} " como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que también es un grupo ciclico; es decir, una porción monovalente obtenida mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo alicíclico de un compuesto hidrocarburo cíclico (carbocíclico), cuya porción tiene de 3 a 7 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 7 átomos de anillo.

10 Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, aquellos derivados de:

compuestos hidrocarburos monocíclicos saturados:

15 ciclopropano (C_3), ciclobutano (C_4), ciclopentano (C_5), ciclohexano (C_6), cicloheptano (C_7), metilciclopropano (C_4), dimetilciclopropano (C_5), metilciclobutano (C_5), dimetilciclobutano (C_6), metilciclopentano (C_6), dimetilciclopentano (C_7) y metilciclohexano (C_7);

compuestos hidrocarburos monocíclicos insaturados:

20 ciclopropeno (C_3), ciclobuteno (C_4), ciclopenteno (C_5), ciclohexeno (C_6), metilciclopropeno (C_4), dimetilciclopropeno (C_5), metilciclobuteno (C_5), dimetilciclobuteno (C_6), metilciclopenteno (C_6), dimetilciclopenteno (C_7) y metilciclohexeno (C_7); y

compuestos hidrocarburos policíclicos saturados:

25 norcarano (C_7), norpinano (C_7), norbornano (C_7).

30 Heterociclijo C_{3-20} : La expresión "heterociclijo C_{3-20} " como se usa en el presente documento, se refiere a una porción monovalente obtenida mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo de un compuesto heterocíclico, cuya porción tiene de 3 a 20 átomos de anillo, de los cuales de 1 a 10 son heteroátomos de anillo. Preferiblemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de anillo, de los cuales de 1 a 4 son heteroátomos de anillo. En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C_{3-20} , C_{3-7} , C_{5-6} , etc.) indican el número de átomos del anillo, o el intervalo del número de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "heterociclijo C_{5-6} ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclijo que tiene 5 o 6 átomos de anillo.

35 Los ejemplos de grupos heterociclicos monocíclicos incluyen, aquellos derivados de:

40 N_1 : aziridina (C_3), azetidina (C_4), pirrolidina (tetrahidropirrol) (C_3), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol) (C_5), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C_5), piperidina (C_6), dihidropiridina (C_6), tetrahidropiridina (C_6), azequina (C_7);

O_1 : oxirano (C_3), oxetano (C_4), oxolano (tetrahidrofurano) (C_5), oxol (dihidrofurano) (C_5), oxano (tetrahidropirano) (C_6), dihidropirano (C_6), pirano (C_6), oxepina (C_7);

45 S_1 : tiirano (C_3), tietano (C_4), tiolano (tetrahidrotiofeno) (C_5), tiane (tetrahidrotiopirano) (C_6), tiepano (C_7); O_2 : dioxolano (C_5), dioxano (C_6), y dioxepano (C_7);

O_3 : trioxano (C_6);

N_2 : imidazolidina (C_5), pirazolidina (diazolidina) (C_5), imidazolina (C_5), pirazolina (dihidropirazol) (C_5), piperazina (C_6);

N_1O_1 : tetrahidrooxazol (C_5), dihidrooxazol (C_5), tetrahidroisoxazol (C_5), dihidroisoxazol (C_5), morfolina (C_6), tetrahidrooxazina (C_6), dihidrooxazina (C_6), oxazina (C_6);

50 N_1S_1 : tiazolina (C_5), tiazolidina (C_5), tiomorfolina (C_6);

N_2O_1 : oxadiazina (C_6);

O_1S_1 : oxatiol (C_5) y oxatiano (tioxano) (C_6); y

$\text{N}_1\text{O}_1\text{S}_1$: oxatiazina (C_6).

55 Los ejemplos de grupos heterociclicos monocíclicos sustituidos incluyen aquellos derivados de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C_5), tales como arabinofurano, lixofurano, ribofurano, y xilofurano, y piranosas (C_6), tales como alopirano, altropirano, glucopirano, manopirano, gulopirano, idopirano, galactopirano, y talopirano.

60 Arilo C_{5-20} : La expresión "arilo C_{5-20} ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción monovalente obtenida mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo aromático de un compuesto aromático, cuya porción tiene de 3 a 20 átomos de anillo. Preferiblemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos de anillo.

65 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C_{3-20} , C_{5-7} , C_{5-6} , etc.) indican el número de átomos del anillo, o el intervalo del número de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "arilo C_{5-6} " como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos de anillo.

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

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen, aquellos derivados 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, al menos uno de los cuales es un anillo aromático, incluyen, grupos derivados 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 de anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en "grupos heteroarilo". Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados 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 fusionados, incluyen, C₉ (con 2 anillos fusionados) derivado de benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indol (N₁), isoindol (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purina (N₄) (por ejemplo, adenina, guanina, benzimidazol (N₂), indazol (N₂), benzoxazol (N₁O₁), benzisoxazol (N₁O₁), benzodioxol (O₂), benzofurazano (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S); C₁₀ (con 2 anillos fusionados) derivados de cromo (O₁), isocromo (O₁), cromano (O₁), isocromano (O₁), benzodioxano (O₂), quinolina (N₁), isoquinolina (N₁), quinolizina (N₁), benzoxazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), quinoxalina (N₂), quinazolina (N₂), cinolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄); C₁₁ (con 2 anillos fusionados) derivados de benzodiazepina (N₂); C₁₃ (con 3 anillos fusionados) derivados de carbazol (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofeno (S₁), carbolina (N₂), perimidina (N₂), piridoindol (N₂); y C₁₄ (con 3 anillos condensados) derivados 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, ya sean solos o como parte de otro sustituyente, pueden estar por sí solos opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados de ellos mismos y los sustituyentes adicionales enlistados a continuación.

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

Hidroxi: -OH.

Éter: -OR, en donde R es un sustituyente éter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado como un grupo alcoxi C₁₋₇, descrito a continuación), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ (también denominado como un grupo heterociclioxi C₃₋₂₀), o un grupo arilo C₆₋₂₀ (también denominado como un grupo C₅₋₂₀), preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇.

Alcoxi: -OR, en la que R' es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₇ incluyen, -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 donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes acetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente 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 cuales están unidos, y los átomos de carbono a los cuales están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos de anillo. Los ejemplos de grupos acetal incluyen, -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂, y -CH(OMe)(OEt).

Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), en donde R¹ es un sustituyentes hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).

Cetal: $-\text{CR}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$, donde R^1 y R^2 son como se han 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} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos cetales incluyen, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})_2$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OEt})_2$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})(\text{OEt})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})_2$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OEt})_2$, y $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})(\text{OEt})$.

5 Hemicetal: $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, donde R^1 es como se ha definido para hemiacetales, y R es un sustituyente de 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} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos hemiacetales incluyen, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$, y $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$.

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

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

15 Imino (imina): $=\text{NR}$, en donde 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} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen $=\text{NH}$, $=\text{NMe}$, $=\text{NEt}$, y $=\text{NPh}$.
 $=\text{NPh}$.

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

25 Acilo (ceto): $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, en donde R es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como alquilacilo C_{1-7} o alcanoililo C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también denominado como heterocicililacilo C_{3-20}), o un grupo arilo C_{5-20} (también denominado como arilacilo C_{5-20}), preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos acilo incluyen $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ (propionilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (t-butirilo), y $-\text{C}(=\text{O})\text{Ph}$ (benzoilo, fenona). Carboxi (ácido carboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

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

30 Tiolocarboxi (ácido tiolocarboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{SH}$.

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

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

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

40 Éster (carboxilato, éster del ácido carboxílico, oxicarbonilo): $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$, en donde 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} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ y $-\text{C}(=\text{O})\text{OPh}$.
 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, y $-\text{C}(=\text{O})\text{OPh}$.

45 Aciloxi (éster inverso): $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$, en donde 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} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos aciloxi incluyen, $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (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 $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$.

50 Oxicarboiloxi: $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$, en donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo, o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos éster incluyen $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, y $-\text{OC}(=\text{O})\text{OPh}$.

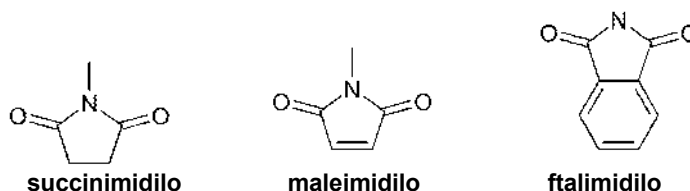
55 Amino: $-\text{NR}^1\text{R}^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como alquilamino C_{1-7} o di-alquilamino C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente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

60 Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, 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.

65

Tioamido (tiocarbamilo): $-C(=S)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$, y $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

5 Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, en donde 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} , preferiblemente 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} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos acilamida incluyen, $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$, y $-NHC(=O)Ph$. R^1 y R^2 pueden formar juntos una estructura cíclica, como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo, y ftalimidilo:

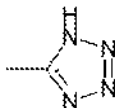


Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$, y $-OC(=O)NEt_2$.

15 Ureido: $-N(R^1)CONR^2R^3$ en donde R^2 y R^3 son independientemente sustituyentes de amino, como se definen 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} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos ureido incluyen, $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHET$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHET$, $-NMeCONMe_2$, y $-NMeCONEt_2$.

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

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



25 Imino: $=NR$, en donde R es un sustituyente de imino, por ejemplo, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{6-20} , preferiblemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos imino incluyen, $=NH$, $=NMe$, y $=NEt$.

30 Amidina (amidino): $-C(-NR)NR_2$, en donde cada R es un sustituyente de amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos amidina incluyen, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NH)NMe_2$, y $-C(=NMe)NMe_2$.

35 $-C(=NH)NMe_2$, y $-C(=NMe)NMe_2$.

Nitro: $-NO_2$.

40 Nitroso: $-NO$.

Azido: $-N_3$.

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

45 Isociano: $-NC$.

Cianato: $-OCN$.

Isocianato: $-NCO$.

50 Tiociano (tiocianato): $-SCN$.

Isotiociano (isotiocianato): $-NCS$.

Sulfhidrilo (tiol, mercapto): -SH.

Tioéter (sulfuro): -SR, en donde R es un sustituyente de tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado como un grupo alquilitio C₁₋₁₈), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alquilitio C₁₋₇ incluyen, -SCH₃ y -SCH₂CH₃.

-SCH₃ y -SCH₂CH₃.

Disulfuro: -SS-R, en donde R es un sustituyente de disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado en el presente documento como disulfuro de alquilo C₁₋₇). Los ejemplos de grupos disulfuro de alquilo C₁₋₇ incluyen, -SSCH₃ y -SSCH₂CH₃.

-SSCH₃ y -SSCH₂CH₃.

Sulfina (sulfino, sulfóxido): -S(=O)R, en donde R es un sustituyente de sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfina incluyen, pero sin limitación, -S(=O)CH₃ y -S(=O)CH₂CH₃. Sulfona (sulfonilo): -S(=O)₂R, en donde R es un sustituyente de sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇, incluyendo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ fluorado o perfluorado. Los ejemplos de grupos sulfona incluyen, -S(=O)₂CH₃ (metanosulfonilo, mesilo), -S(=O)₂CF₃ (triflilo), -S(=O)₂CH₂CH₃ (esilo), -S(=O)₂C₄F₉ (nonaflilo), -S(=O)₂CH₂CF₃ (tresilo), -S(=O)₂CH₂CH₂NH₂ (taurilo), -S(=O)₂Ph (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-clorofenilsulfonilo (closilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalenosulfonato (napsilo), y 5-dimetilaminonaftalen-1-ilsulfonato (dansilo).

Ácido sulfínico (sulfino): -S(=O)OH, -SO₂H.

Ácido sulfónico (sulfo): -S(=O)₂OH, -SO₃H.

Sulfinato (éster del ácido sulfínico): -S(=O)OR; en donde R es un sustituyente de sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfinato incluyen, -S(=O)OCH₃ (metoxisulfinilo; metil sulfinato) y -S(=O)OCH₂CH₃ (etoxisulfinilo; sulfinato de etilo).

Sulfonato (éster del ácido sulfónico): -S(=O)₂OR, en donde R es un sustituyente de sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfonato incluyen, -S(=O)₂OCH₃ (metoxisulfonylo; metilsulfonato) y -S(=O)₂OCH₂CH₃ (etoxisulfonylo; etilsulfonato).

Sulfiniloxi: -OS(=O)R, en donde R es un sustituyente de sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen, -OS(=O)CH₃ y -OS(=O)CH₂CH₃.

Sulfoniloxi: -OS(=O)₂R, en donde R es un sustituyente de sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen, -OS(=O)₂CH₃ (mesilato) y -OS(=O)₂CH₂CH₃ (esilato).

Sulfato: -OS(=O)₂OR; en donde R es un sustituyente de sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfato incluyen, -OS(=O)₂OCH₃ y -SO(=O)₂OCH₂CH₃.

Sulfamilo (sulfamoilo; amida del ácido sulfínico; sulfinamida): -S(=O)NR¹R², en donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamilo incluyen, S(O)NH₂, -S(=O)NH(CH₃), -S(=O)N(CH₃)₂, -S(=O)NH(CH₂CH₃), -S(=O)N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)NHPH.

Sulfonamido (sulfinamoilo; amida del ácido sulfónico; sulfonamida): -S(=O)₂NR¹R², en donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, -S(=O)₂NH₂, -S(=O)₂NH(CH₃), -S(=O)₂N(CH₃)₂, -S(=O)₂NH(CH₂CH₃), -S(=O)₂N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)₂NHPH.

Sulfamino: -NR¹S(=O)₂OH, en donde R¹ es un sustituyente de amino, como se define para grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamino incluyen, -NHS(=O)₂OH y -N(CH₃)S(=O)₂OH.

Sulfonamino: -NR¹S(=O)₂R, en donde R¹ es un sustituyente de amino, como se definen para grupos amino,

y R es un sustituyente de sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfonamino incluyen, -NHS(=O)₂CH₃ y -N(CH₃)S(=O)₂C₆H₅.

5 Sulfinamino: -NR¹S(=O)R, en donde R¹ es un sustituyente de amino, como se definen para grupos amino, y R es un sustituyente de sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfinamino incluyen, -NHS(=O)CH₃ y -N(CH₃)S(=O)C₆H₅.

10 Fosfino (fosfeno): -PR₂, en donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfino incluyen, -PH₂, -P(CH₃)₂, -P(CH₂CH₃)₂, -P(t-Bu)₂, y -P(Ph)₂.

Fosfo: -P(=O)₂.

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

20 Ácido fosfónico (fosfeno): -P(=O)(OH)₂.

Fosfonato (fosfeno éster): -P(=O)(OR)₂, donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfonato incluyen -P(=O)(OCH₃)₂, -P(=O)(OCH₂CH₃)₂, -P(=O)(O-t-Bu)₂, y -P(=O)(OPh)₂.

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

30 Fosfato (fosfonooxi éster): -OP(=O)(OR)₂, donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfato incluyen, -OP(=O)(OCH₃)₂, -OP(=O)(OCH₂CH₃)₂, -OP(=O)(O-t-Bu)₂, y -OP(=O)(OPh)₂.

35 Ácido fosforoso: -OP(OH)₂.

Fosfito: -OP(OR)₂, donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosfito incluyen -OP(OCH₃)₂, -OP(OCH₂CH₃)₂, -OP(O-t-Bu)₂, y -OP(OPh)₂.

40 Fosforamidita: -OP(OR¹)-NR²₂, donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosforamidato incluyen, -OP(OCH₂CH₃)-N(CH₃)₂, -OP(OCH₂CH₃)-N(i-Pr)₂, y -OP(OCH₂CH₂CN)-N(i-Pr)₂.

45 Fosforamidato: -OP(=O)(OR¹)-NR²₂, donde 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, preferiblemente -H, un grupo alquilo C₁₋₇, o un grupo arilo C₅₋₂₀. Los ejemplos de grupos fosforamidato incluyen, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(CH₃)₂, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(i-Pr)₂, y -OP(=O)(OCH₂CH₂CN)-N(i-Pr)₂.

50 Alquileno

Alquileno C₃₋₁₂: La expresión "alquileno C₃₋₁₂", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de bidentato obtenida mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno, ya sea ambos del mismo átomo de carbono o, o, uno de cada uno, de dos átomos de carbono diferentes, de un compuesto que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se especifique lo contrario), que puede ser alifático o alicíclico, y que puede ser saturado, parcialmente insaturado, o totalmente insaturado. Por lo tanto, el término "alquileno" incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, etc., descritas más adelante. Los ejemplos de grupos alquileno C₃₋₁₂ lineales saturados incluyen, -(CH₂)_n- en donde n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, -CH₂CH₂CH₂- (propileno), -CH₂CH₂CH₂CH₂- (butileno), -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (pentileno) y -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (heptileno).

60 Los ejemplos de grupos alquileno C₃₋₁₂ saturados ramificados incluyen, -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 lineales parcialmente insaturados (alquileno C₃₋₁₂, grupos alquinileno) incluyen -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 ramificados parcialmente insaturados (alquenileno C₃₋₁₂ y grupos alquinileno) incluyen, -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, ciclopentileno (por ejemplo, ciclopent-1,3-ileno), y ciclohexileno (por ejemplo, ciclohex-1,4-ileno).

10 Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ alicíclicos parcialmente insaturados (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen, 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).

Otras formas incluidas

15 A menos que se especifique lo contrario, se incluyen en los anteriores las bien conocidas formas iónicas, sal, solvato, y formas protegidas 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 manera similar, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-NH⁺HR⁺R²), una sal o solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal clorhidrato, así como formas protegidas convencionales de un grupo amino. De manera similar, 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, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

30 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces una sal puede formarse con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, iones de metal alcalino, tales como Na⁺ y K⁺, cationes de metal alcalinotérreo, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes, tales como Al³⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, ión amonio (es decir, NH₄⁺) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Son ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados, aquellos obtenidos a partir de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, 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 de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

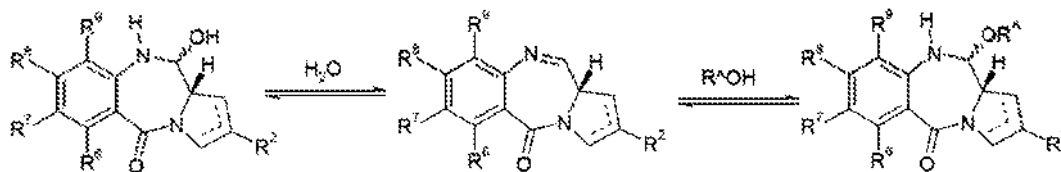
40 Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces una sal puede formarse con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos adecuados: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

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

Solvatos

55 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar 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 soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

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



5 Estas formas pueden ser llamadas las formas carbinolamina y éter carbinolamina de la PBD (tal como se describe en la sección relativa a R¹⁰ anterior). El balance de estos equilibrios depende de las condiciones en que se encuentran los compuestos, así como la naturaleza de la propia porción. Estos compuestos particulares se pueden aislar en forma sólida, por ejemplo, mediante 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 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 *synclinales* y *anticlinales*; formas α - y β -; formas *axiales* y *ecuatoriales*; formas de *bote*, *silla*, *retorcida*, *de sobre*, y *semisilla*; y combinaciones de las mismas, en lo sucesivo denominadas colectivamente "isómeros" (o "formas isoméricas").

20 El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

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

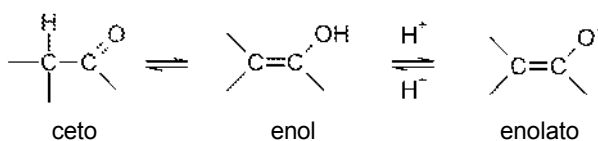
25 "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales, y reactividades. Pueden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

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

35 Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en el presente documento siguen generalmente 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 diaestereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar 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 en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos *d* y *l* o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación de la luz polarizada en el plano por el compuesto, significando (-) 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 específico también puede denominarse enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se llama normalmente una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como una mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

50 Se debe tener en cuenta que, excepto como se describe más adelante para formas tautoméricas, específicamente excluidos del término "isómeros", tal como se usa en el presente documento, están isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que se diferencian en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por 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 manera similar, una referencia a un grupo orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir perfectamente formas estructuralmente isoméricas incluidas dentro de esa 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).

La exclusión anterior no es válida para formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto-, enol-, y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hiroxiazio y nitro/aci-nitro.



5 La expresión "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de energías diferentes que son interconvertibles mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, tautómeros de protón (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 enlace.

10 Obsérvese 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 ;

15 Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, y cloro, tales como, ^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 . Varios compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los cuales se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H , ^{13}C , y ^{14}C . Tales 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 sólo fotón (SPECT) incluyendo ensayos de distribución en tejido de fármaco o sustrato, o en tratamiento radioactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos sustituidos o marcados con deuterio de la invención pueden tener propiedades MFFC mejoradas (metabolismo de fármaco y farmacocinética), relacionadas con la distribución, metabolismo, y excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados, tales como deuterio puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado con ^{18}F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Generalmente, pueden prepararse compuestos de la presente invención y profármacos de los mismos isotópicamente marcados, realizando los procedimientos descritos en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritas más adelante, sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible. Además, la sustitución con isótopos más pesados, en particular deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos, o una mejora en el índice terapéutico. En este contexto, se entiende se hace referencia a deuterio como un sustituyente. La concentración de tal isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse mediante un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de la presente invención, cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular, pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo.

40 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluyen todas esas formas isoméricas, incluyendo (total o parcialmente) mezclas racémicas y otras de los mismos. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas son ya sea conocidos en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento, u otros métodos, de una manera conocida.

45 **Actividad biológica**

Ensayos de proliferación celular *in vitro*

50 Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) se mide mediante: exposición de células de mamífero que tienen proteínas receptoras, por ejemplo, HER2, para el anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivo de las células durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medición de la viabilidad celular. Se utilizaron ensayos *in vitro* basados en células para medir viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de la apoptosis (activación de caspasas) de un ADC de la invención.

55 La potencia *in vitro* de conjugados anticuerpo-fármaco se puede medir mediante un ensayo de proliferación celular. El CellTiter-Glo® Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente es comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI), el método de ensayo homogéneo basado en la expresión recombinante de la luciferasa del orden Coleoptera (Patentes norteamericanas N.º 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; documento US 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo® se llevó a cabo en formato de 96 pocillos, por lo que es susceptible de cribado de alto rendimiento

5 automatizado (HTS) (Cree et al (1995) Anticancer Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo único (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requieren el lavado, la eliminación del medio ni múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan pocas como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de la adición del reactivo y mezclado. Las células se pueden tratar de continuamente con el ADC, o se pueden tratar y separar del ADC. En general, las células tratadas brevemente, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células tratadas continuamente.

10 El formato homogéneo "adición-mezcla-medición" da 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 el cultivo. El Ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente de "tipo resplandor", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una vida media generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de células y medio utilizado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luz (RLU). El sustrato, Luciferina de Escarabajo, se descarboxila oxidativamente mediante la luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión concomitante de ATP a AMP y generación de fotones.

15 Eficacia *in vivo*

20 La eficacia *in vivo* del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención se puede medir mediante estudios de xenoinjertos de tumores en ratones. Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de un ADC anti-HER2 de la invención se puede medir mediante un modelo de explante de ratón transgénico HER2 de alta expresión. Un aloinjerto se propaga desde el ratón transgénico MMTV Fo5 que no responde a, o responde escasamente a, la terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos se trataron una vez con ADC a ciertos niveles de dosis (mg/kg) y exposición al fármaco PBD ($\mu\text{g}/\text{m}^2$); y tampón control de placebo (Vehículo) y se monitorearon durante dos semanas o más para medir el tiempo de duplicación del tumor, la muerte celular logarítmica, y la reducción del tumor.

25 Uso

30 Los conjugados de la invención se pueden utilizar para proporcionar un compuesto de PBD en una ubicación objetivo.

La ubicación objetivo preferiblemente es una población celular proliferativa. El anticuerpo es un anticuerpo para un antígeno presente en una población celular proliferativa.

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

40 En la ubicación objetivo, el enlazador puede ser escindido para liberar un compuesto de las fórmulas B o C. De esta manera, el conjugado se puede utilizar para proporcionar selectivamente un compuesto de las fórmulas B o C a la ubicación objetivo.

El enlazador puede ser escindido por un enzima presente en la ubicación objetivo.

45 La ubicación objetivo puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

50 Los compuestos conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención incluyen aquellos que tienen utilidad para la actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido covalentemente mediante un enlazador, a una porción de fármaco PBD, es decir, toxina. Cuando el fármaco no está conjugado a un anticuerpo, el fármaco PBD tiene un efecto citotóxico. La actividad biológica de la porción de fármaco PBD se modula de esta manera mediante la conjugación a un anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención suministran selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico al tejido tumoral mediante lo cual se puede lograr una mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja.

55 De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto conjugado tal como se describe en el presente documento para usarse en terapia.

60 En un aspecto adicional, también se proporciona un compuesto conjugado tal como se describe en el presente documento para usarse en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. 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.

65 Un experto en la técnica es fácilmente capaz de determinar si un conjugado candidato trata o no una condición proliferativa para cualquier tipo de célula particular. Por ejemplo, ensayos que se pueden utilizar de manera conveniente para valorar la actividad ofrecida por un compuesto particular se describen a continuación en los ejemplos.

La expresión "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o no controlada de células excesivas o anormales que no se desea, tales como, crecimiento neoplásico o hiperplásico, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Los ejemplos de trastornos proliferativos incluyen proliferación celular benigna, pre-maligna y maligna, incluyendo neoplasmas y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos), y aterosclerosis. Los cánceres de particular interés incluyen, leucemias y cánceres ováricos.

Puede tratarse cualquier tipo de célula, incluyendo de pulmón, gastrointestinal (incluyendo, por ejemplo, de intestino, colon), de mama (mamaria), de ovario, de próstata, de hígado (hepática), de riñón (renal), la vejiga, páncreas, cerebro, y de la piel.

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

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

Se contempla que los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención se pueden utilizar para tratar diversas enfermedades o trastornos, caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos; leucemia, malignidades hematológica y linfóide. Otros incluyen trastornos neuronal, glial, astrocital, del hipotálamo, glandular, macrofágico, EPitelial, estromal, blastocélico, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo autoinmune, trastornos. En general, la enfermedad o trastorno a tratar es una enfermedad hiperproliferativa tal como el cáncer. Los ejemplos de cáncer a tratar en el presente documento incluyen, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides malignas. Los ejemplos de cánceres más particulares incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer microcítico de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Las enfermedades autoinmunes para las cuales los compuestos de ADC se pueden utilizar en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus tal como SLE y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos gastrointestinales autoinmunes y hepáticos (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, y enfermedad celiaca), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliarteritis), trastornos neurológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonía-mioclonía, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, hives, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso, y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional, y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveitis, enfermedades de audición autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y trastornos endocrinos autoinmunes (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad de Addison, y enfermedad tiroidea autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y la tiroiditis)). Tales enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis, y glomerulonefritis.

Métodos de tratamiento

Los conjugados de la presente invención se pueden utilizar en un método de terapia. También se proporcionan conjugados para su uso en un método de tratamiento, que comprende administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conjugado de la invención. "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser por lo menos la mejoría de por lo menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y curso de tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, está dentro de la responsabilidad de los médicos de medicina general y otros

doctores.

Un compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección que se trate. Los ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, por ejemplo, fármacos, tales como agentes quimioterapéuticos); cirugía; y terapia de radiación.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas inhibidores del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizantes e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS N.º 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS N.º 391210-10-9, Pfizer), cisplatina (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS N.º 15663-27-1), carboplatino (CAS N.º 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HER-CEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS N.º 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, y rapamicina.

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatin (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNSTINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de Imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), 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), lona-farnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (libre de Cremophor), formulaciones en nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucil; AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), alcanfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocua, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sacrodictina; espongiatrina, mostazas de nitrógeno, tales como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo caliqueamicina, caliqueamicina gamma 11, caliqueamicina omega 11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína de enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona, antiadrenales como aminoglutimida, mitotano, trilostano; rellenanor de ácido fólico, tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona, elfornitina; acetato de eliptinio, una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxurea, lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofílnico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina, tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol, mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida, tiotepa; 6-tioguanina;

mercaptapurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina, etopósido (VP-16); mitoxantrona; vincristina, vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina, capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, Y117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, 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) anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, feuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina en el nucleósido 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de la proteína quinasa tales como inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, en particular aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e 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 topoisomerasa 1, tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® mRH; (ix) agentes antiangiogénicos, tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNISTARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia), y el conjugado farmacológico del anticuerpo, gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

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

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un compuesto conjugado, un excipiente farmacéuticamente aceptable, transportador, tampón, estabilizador u otros materiales bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente 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. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tales como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir una solución salina fisiológica, una solución de dextrosa u otros sacáridos o glicoles, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido tal como una gelatina.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la dolencia, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y que tenga un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de cloruro de sodio, Inyección de Ringer, Inyección de Ringer Lactato. Conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos se pueden incluir, según sea necesario.

Formulaciones

Aunque es posible que el compuesto conjugado sea utilizado (por ejemplo, administrado) solo, a menudo es preferible presentarlo como una composición o formulación.

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

5 En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto conjugado, tal como se describe en el presente documento, junto con otro uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, transportadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, y agentes edulcorantes.

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

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

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar por lo menos un conjugado radiomarcado con [¹¹C] o compuesto similar a conjugado, tal como se define en el presente documento, junto con otro uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formula como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto activo.

25 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada transportador, diluyente, excipiente, etc. también tiene que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

30 Las formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto activo con un transportador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el compuesto activo con los transportadores (por ejemplo, transportadores líquidos, transportador sólido finamente dividido, etc.), y después dar forma al producto, si fuera necesario.

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

40 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección), incluyen líquidos acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, estériles (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en las que el ingrediente activo se disuelve, suspende, o de otro modo proporciona (por ejemplo, en un liposoma u otra forma microparticulada). Dichos líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes suspensores, agentes espesantes, y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor pretendido. Los ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales, y similares. Los ejemplos de transportadores isotónicos adecuados para su uso en formulaciones incluyen cloruro de sodio inyectable, solución de Ringer, o inyección de Ringer Lactado. Normalmente, la concentración del ingrediente activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores sellados monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) requiriendo únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos.

Dosificación

45 Se apreciará por un experto en la técnica que las dosificaciones apropiadas del compuesto conjugado, y de las composiciones que comprenden el compuesto conjugado, pueden variar de un paciente a otro. Determinar la dosificación óptima incluirá generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores incluyendo, la actividad del compuesto particular, de la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto, de la duración del tratamiento, de otros fármacos, compuestos, y/o materiales usados en combinación, de la severidad

de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, afección, el estado de salud general, e historial médico anterior del paciente. La cantidad de compuesto y vía de administración será en última instancia a discreción del médico, veterinario, o clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que puedan lograr el efecto deseado sin causar efectos secundarios dañinos o perjudiciales sustanciales.

La administración puede efectuarse en una dosis, de manera continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos adecuados) a lo largo del curso de tratamiento. Los métodos para determinar los medios más efectivos y dosificación de la administración son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para terapia, el propósito de la terapia, la(s) célula(s) que se estén tratando, y el sujeto que se está tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples con el nivel y pauta de dosificación seleccionándose por el médico tratante, veterinario, o clínico.

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 por día. En los casos donde el compuesto activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto parental y por lo tanto el peso real a usar se 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.

Sin embargo, en una modalidad, el compuesto conjugado se administra a un paciente humano de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: aproximadamente 50 o aproximadamente 75 mg, 3 o 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 dosificación descritas anteriormente se pueden aplicar al conjugado (incluyendo la porción de PBD y el enlazador al anticuerpo) o a la cantidad eficaz del compuesto de PBD proporcionado, por ejemplo, la cantidad de compuesto que es liberable después de la escisión del enlazador.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC de la invención dependerá del tipo de enfermedad que será tratada, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y curso de la enfermedad, si la molécula se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico tratante. La molécula se administra de manera adecuada al paciente una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación ejemplar de ADC para ser administrada a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Un régimen de dosificación ejemplar comprende un curso de la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de dosis adicionales cada semana, dos semanas, o tres semanas de un ADC. Pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Tratamiento

El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento en el contexto de tratar una afección, se refiere generalmente al tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en las que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o progreso de la afección, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, regresión de la afección, una mejora de la afección, y la cura de la afección. El tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención) también se incluye.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, el

cual es efectivo para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con una pauta de tratamiento deseada.

De manera similar, La expresión "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, el cual es efectivo para producir algún efecto profiláctico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con una pauta de tratamiento deseada.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

Los conjugados anticuerpo-fármaco se pueden preparar mediante varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, afecciones, y reactivos conocidos por aquellos expertos en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazante bivalente, para formar un intermediario anticuerpo-enlazador Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con un reactivo de porción de fármaco activado; y (2) reacción de un reactivo de porción de fármaco con un reactivo enlazador, para formar un reactivo fármaco-enlazador D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el nucleófilo de un anticuerpo. Se pueden emplear métodos de conjugación (1) y (2) con varios anticuerpos, y enlazadores para preparar el conjugado anticuerpo-fármaco de la invención.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína. Los grupos tiol son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en porciones de enlazador tales como aquellos de la presente invención. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente disulfuro de cisteína formará de esta manera, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un animal, mamífero, un mamífero placentario, un marsupial

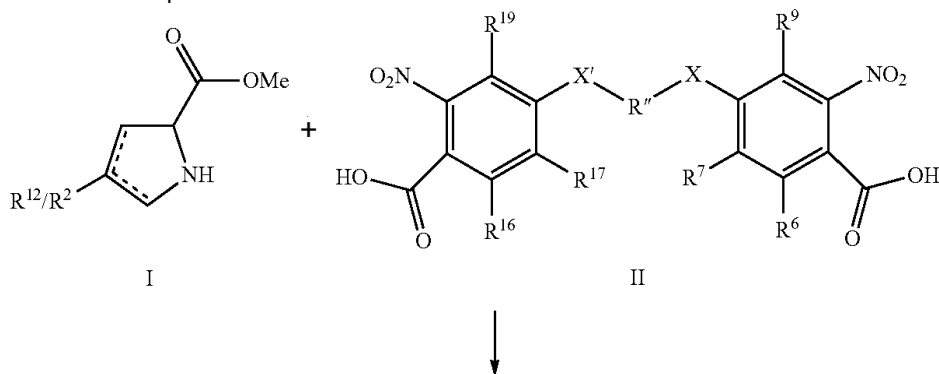
(por ejemplo, canguro, wombat), un monotrema (por ejemplo, ornitorrinco), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murinos (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un pájaro), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, tíf común, babuino), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

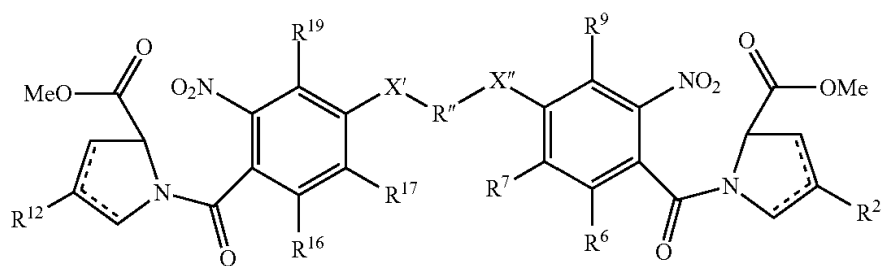
Además, el sujeto/paciente puede ser cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto. En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

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

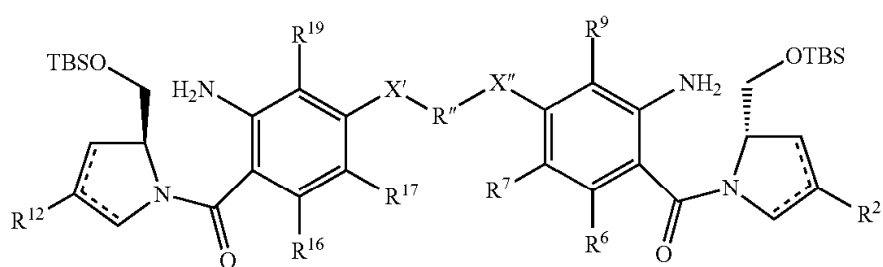
Síntesis

Una posible ruta de síntesis para un intermediario dímero de fórmula VIII se muestra a continuación:

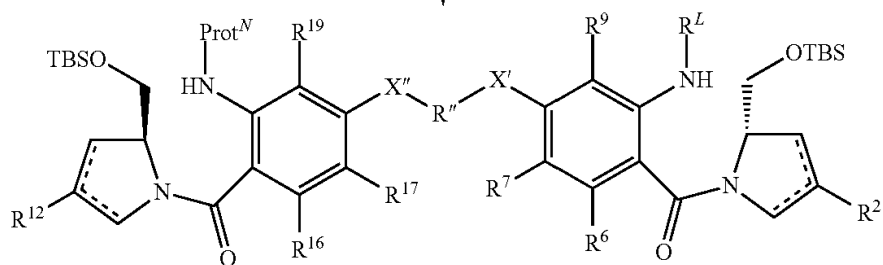




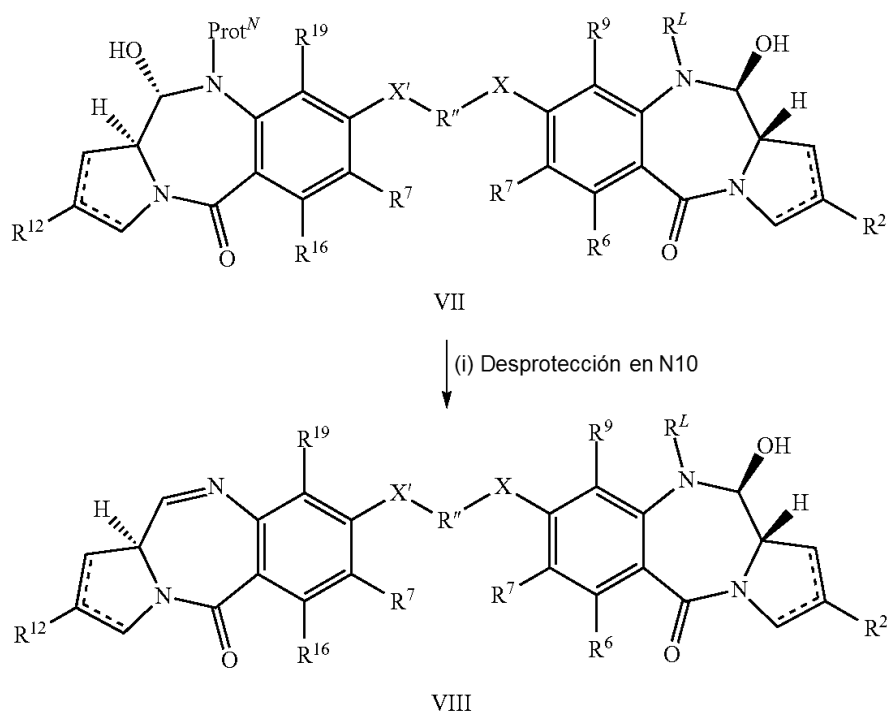
(i) Reducción de éster
(ii) Protección de sililo
(iii) Reducción de nitro



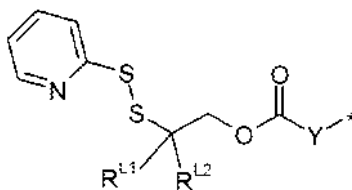
(i) Protección en N10
(ii) Adición de enlazador mediada con isocianato



(i) Desprotección de sililo
(ii) Ciclización



En el esquema anterior, R^L representa:



5

10

En general, dímeros asimétricos, con respecto a sus enlaces N10-C11, se pueden preparar mediante el tratamiento de compuestos bis-amino de fórmula IV con un equivalente de un reactivo de cloroformiato comercialmente disponible (o preparado fácilmente) con el fin de romper la simetría de las moléculas. La amina libre restante posteriormente se puede funcionalizar independientemente para introducir el precursor de grupo enlazador (RL). La manipulación del grupo funcional adicional para cerrar el anillo B de PBD, eliminar los grupos protectores proporciona la molécula objetivo.

15

20

Los compuestos de fórmula IV se preparan normalmente mediante el acoplamiento de un fragmento de anillo C funcionalizado adecuadamente (I) a un núcleo de dímero que contiene el anillo A de fórmula II. Los fragmentos del anillo C se pueden preparar a partir de bloques de construcción de 4-oxoprolinato de metilo protegido por carbamato. La olefinación bajo condiciones de Wittig o Horner-Emmons se puede emplear para proporcionar alquenos endo- o exo- insaturados. Los fragmentos del anillo C y del anillo A se pueden acoplar bajo condiciones estándar en presencia de trietilamina, utilizando derivados de cloruro de ácido de los fragmentos del anillo A para dar moléculas de fórmula III. La simetría también se puede romper en esta etapa mediante la introducción de diferentes anillos C. Los compuestos de tipo III se pueden reducir, sin afectar a la endo o exo insaturación del anillo C, con zinc en ácido acético o fórmico para producir moléculas de fórmula IV.

25

Como alternativa, un bloque de construcción de 4-hidroxi pirrolidina adecuado se puede acoplar a un núcleo de dímero de fórmula II. Los grupos hidroxilo se pueden oxidar a cetonas y posteriormente convertir a triflatos de enol. El acoplamiento de Suzuki se puede utilizar para introducir los sustituyentes pro C2 (por ejemplo, arilo, alqueno, etc.). Los grupos nitro se pueden reducir posteriormente a aminas, una amina se protege dejando la otra libre para llevar el grupo enlazador.

30

Los carbamatos asimétricos de tipo VI se pueden preparar mediante el tratamiento de bis-aminas de tipo IV con un solo equivalente de un cloroformiato comercialmente disponible (o preparado fácilmente) en presencia de piridina o trietilamina. Los cloroformiatos se pueden seleccionar para proporcionar grupos protectores de nitrógeno a base de carbamato apropiados ($Prot^N$) que son ortogonales con respecto a aquellos utilizados en el grupo pro-enlazador (R^L). El carbamato R^L se puede introducir mediante la conversión del grupo amino restante a un isocianato y enfriamiento

rápido del mismo con el alcohol R^L. Alternativamente, el alcohol RL se puede convertir a un cloroformiato o equivalente funcional (fluoroformiato, p-nitrocarbonato, pentafluorocarbonato o carbonato de hidroxibenzotriazol). Finalmente, el grupo amino restante se puede convertir a un p-nitrocarbamato, pentafluorocarbamato o carbamato de hidroxibenzotriazol reactivos que se puede desplazar con el alcohol R^L para proporcionar moléculas de fórmula VI.

5 Las moléculas de fórmula VII se puede preparar a partir de moléculas de fórmula VI mediante la eliminación de los grupos protectores de sililo, con, por ejemplo, ácido acético acuoso. La oxidación con peryodinano de Dess-Martin (o, alternativamente, TPAP/NMO, PDC o bajo condiciones de Swern) proporciona el producto cerrado de anillo.

10 Los conjugados de fórmula V se pueden preparar a partir de moléculas de fórmula VII mediante la eliminación del grupo protector de nitrógeno basado en carbamato.

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

15 *Compuesto II*

La síntesis de los compuestos de fórmula (II) se describe en la solicitud anterior del solicitante, documento WO 2006/111759 y también se describe por Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001,44, 1161-1174).

20 También se hace referencia a los métodos conocidos de sintetización de dímeros de PBD, incluyendo aquellos revisados en Antonow, D. y Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864.

Puede encontrarse una divulgación pertinente adicional en el documento WO 2010/091150. Los compuestos intermedios descritos en el documento WO 2010/091150 también se pueden emplear en los métodos descritos anteriormente.

25 Por ejemplo, el compuesto dímero (15) mostrado en el párrafo [164] se puede utilizar como el compuesto (III) en el Esquema I anterior. Esta, y adaptaciones adicionales, serían evidentes para un experto en la técnica.

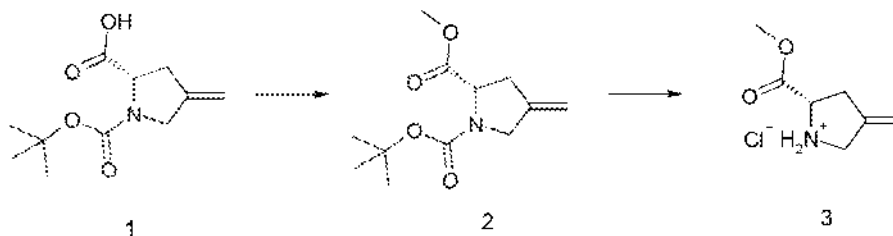
30 **Ejemplos**

Métodos Experimentales Generales

35 Se midieron las rotaciones ópticas en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se indican en g/100 ml. Se midieron los puntos de fusión usando un aparato digital de punto de fusión (Electrothermal). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro de IR Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se indican con respecto a TMS (δ = 0,0 ppm) y las señales se indican como s (singlete), d (doblete), t (tripleto), dt (tripleto doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doble doblote de dobletes) o m (multiplete), dándose las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz). Los datos de la espectroscopía de masas (EM) se recogieron usando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a una HPLC Waters 2695 con una Waters 2996 PDA, y los parámetros Waters Micromass ZQ usados fueron: Capilaridad (kV), 3,38; Cono (V), 35; Extractor (V), 3,0; Temperatura fuente (°C), 100; Temperatura de Desolvatación (°C), 200; Caudal de cono (l/h), 50; Caudal de desolvatación (l/h), 250. Los datos de la espectroscopía de masas de alta resolución (EMAR) se registraron en un Waters Micromass QTOF Global en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas con metal para introducir las muestras en el instrumento. La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄) y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, malla 230-400 ASTM). Excepto para el HOBt (NovaBiochem) y los reactivos con soporte sólido (Argonaut), todas las demás sustancias químicas y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Se prepararon disolventes anhidros por destilación en atmósfera de nitrógeno seco en presencia de un agente secante apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4 Å o sodio. Éter de petróleo se refiere a la fracción que alcanza la ebullición a 40-60 °C.

55 Condiciones generales de CL/EM: 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 y después B del 5 % al 95 % durante 3 min. La composición se mantuvo durante 0,0 min a B al 95 % y después se volvió a B al 5 % en 0,3 minutos. El tiempo de realización total del gradiente fue de 5 min. Caudal 3,0 ml/min, 400 µl se separaron mediante una pieza en forma de T de volumen muerto que pasa al espectrómetro de masas. Rango de detección de longitud de onda: de 220 a 400 nm. Tipo de función: red de diodos (535 exploraciones). Columna: fenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

60

Ejemplo 1**(a) Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio (3)**

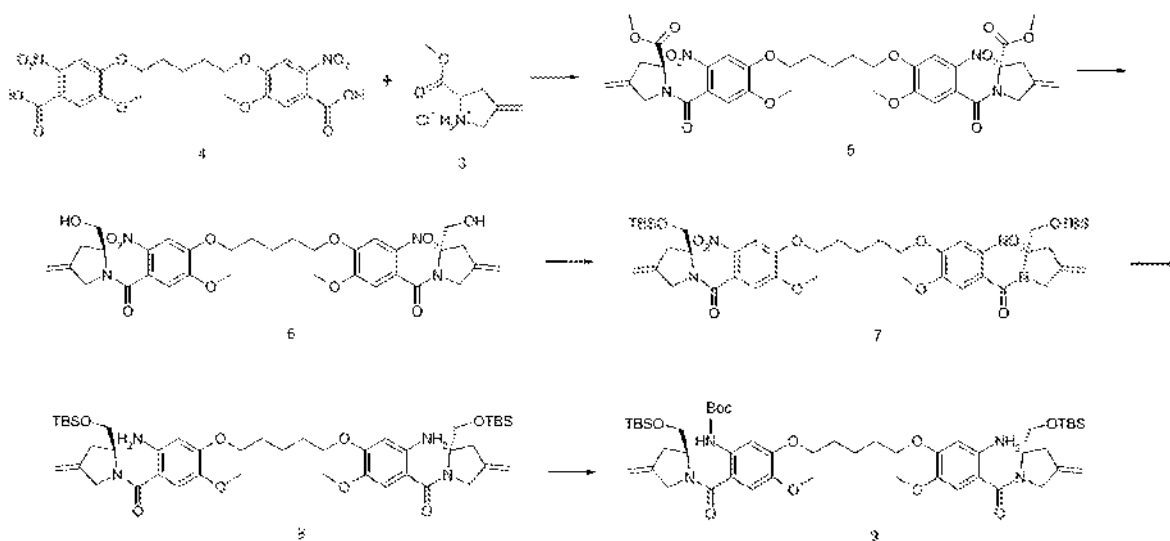
5

(i) 2-metil-4-metilenpirrolidin-1,2-dicarboxilato de (S)-1-terc-butilo (2)

Se añadió carbonato potásico (19,92 g, 14 mmol, 3 equiv.) una solución agitada del ácido carboxílico (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 minutos, 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 retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar un residuo de color amarillo que se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. El acetato de etilo se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar 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 %] para proporcionar el producto en forma de un aceite incoloro. (Compuesto conocido F Manfré *et al.*, J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065)

(ii) (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidinio cloro (3)

Una solución de ácido clorhídrico 4 M en dioxano (63 ml, 254,4 mmol, 4,5 equiv.) se añadió al fragmento del anillo C protegido con Boc (2) (13,67 g, 56,6 mmol, 1 equiv.) a temperatura ambiente. Se observó 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 y se añadió más cantidad de dioxano para facilitar la agitación. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante una hora 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 en forma de un polvo de color blanco (9,42 g, 94 %) (P Herdwijn *et al.*, Canadian Journal of Chemistry, 1982, 60, 2903-7)

(b) (5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-9-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-fenil)carbamato de terc-butilo (9)

35

(i) **(S)**-(4,4'-(*pentan-1,5-diilbis(oxi)*))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (**5**)

5 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 núcleo dimérico (**4**) (11,82 g, 23,9 mmol, 1 equiv.) en DCM anhidro (180 ml) a temperatura ambiente. Se observó una enérgica efervescencia 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 de calcio. 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 anillo C (**3**) (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 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 y se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico acuoso (1 M, 2 x 200 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (2 x 250 ml), agua (250 ml) y salmuera (250 ml), se secó (MgSO₄) y el DCM se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar 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).

(ii) **(S)**-(4,4'-(*pentan-1,5-diilbis(oxi)*))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (**6**)

25 Se añadió en una porción borohidruro de litio sólido (0,093 g, 4,3 mmol, 3 equiv.) a una solución del éster (**5**) (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 minutos y después se dejó calentar a 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 y después se enfrió en un baño de hielo y se trató con agua (20 ml) para dar una suspensión de color amarillo. Se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico (1 M) (¡efervescencia enérgica!) hasta que cesó la efervescencia. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (4 x 50 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml) y se secaron (MgSO₄). El acetato de etilo se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para producir el producto en forma de una espuma de color amarillo (0,96 g, 99 %). La reacción se repitió a una escala de 12,4 g para producir 11,06 g de producto (96 %). Datos analíticos: TR 3,37 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 685 ([M + H]⁺, 100).

(iii) **(S)**-((*pentan-1,5-diilbis(oxi)*))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((*terc-butildimetilsilil*)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (**7**)

40 Una solución de *bis*-nitro alcohol (**6**) (7,94 g, 11,6 mmol, 1 equiv.), cloruro de *terc*-butildimetilsililo (4,54 g, 30,15 mmol, 2,6 equiv.) e imidazol (4,1 g, 60,3 mmol, 5,2 equiv.) en DMF anhidra (100 ml) en una atmósfera de argón se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua (250 ml) y se extrajo con DCM (4 x 100 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua (200 ml) y salmuera saturada (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [de acetato de etilo al 50 %/n-hexano al 50 % a acetato de etilo al 100 % en incrementos del 10 %] para proporcionar el producto en forma de una espuma de color amarillo (10,0 g, 94 %). Datos analíticos: TR 4,57 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 913 ([M + H]⁺, 100).

(iv) **(S)**-((*pentan-1,5-diilbis(oxi)*))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(((*terc-butildimetilsilil*)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (**8**)

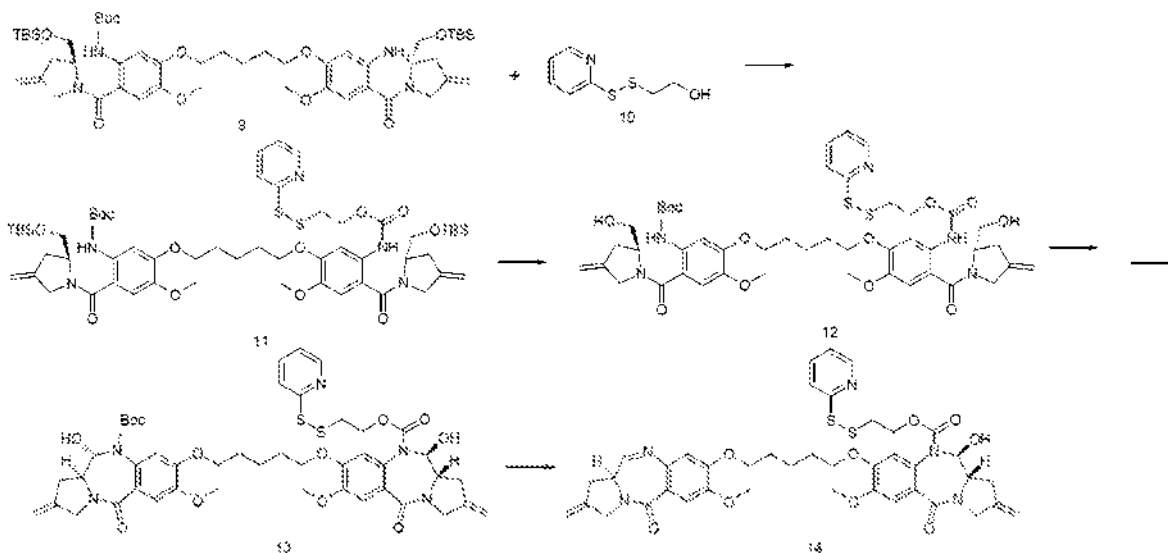
50 Se añadió en una porción una solución de ácido fórmico (al 5 % v/v, 15 ml) a una mezcla de polvo de cinc (29,56 g, 0,45 mol, 40 equiv.) y el compuesto (**7**) (10,34 g, 11,32 mmol, 1 equiv.) en acetato de etilo/etanol (80 ml/150 ml). Se observó una exotermia de 12 °C. Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se filtró a través de celite, lavando con acetato de etilo (en exceso). El filtrado se lavó con bicarbonato sódico saturado (3 x 150 ml), agua (200 ml) y salmuera saturada (200 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [acetato de etilo] dio el producto en forma de una espuma de color blanco (8,09 g, 84 %). Datos analíticos: TR 4,43 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 853 ([M + H]⁺, 100).

(v) **(S)**-((5-((S)-2-(((*terc-butildimetilsilil*)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-(((S)-2-(((*terc-butildimetilsilil*)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-fenil)carbamato de *terc*-butilo (**9**)

65 Una solución de la *bis*-anilina (**8**) (6,02 g, 7,1 mmol, 1 equiv.) y dicarbonato de di-*t*-butilo (1,54 g, 7,1 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (50 ml) se calentó a reflujo durante 16 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [de acetato de etilo al 40 %/n-hexano al 60 % a acetato de etilo al 60 %/n-hexano al 40 % a acetato de etilo al 100 %] para dar el producto en forma de una espuma de color blanco (3,22 g,

48 %). Datos analíticos: TR 4,27 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 953 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 951 ([M - H]⁻, 100).

- 5 (c) 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)-2-(piridin-2-ildisulfanil)etilo (**14**)



10 El Compuesto **10** se preparó de acuerdo con Jones *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 6526-6527.

- (i) (2-(piridin-2-ildisulfanil)etil)-((S)-(pentan-1,5-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de terc-butilo (**11**)

15 Se añadió trietilamina (0,25 g, 0,34 ml, 2,42 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-Boc protegida (**9**) (1,05 g, 1,1 mmol, 1,0 equiv.) y trifosgeno (0,117 g, 0,4 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 y, después de 5 minutos, una muestra se trató con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 4,37 min EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1011 ([M + H]⁺, 100).

20 Una solución de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol (**10**) (0,31 g, 1,65 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,17 g, 0,23 ml, 1,65 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (10 ml) se añadió gota a gota al isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 1,1 h, tiempo después del cual se añadió una porción adicional de trifosgeno (0,058 g, 0,2 mmol, 0,18 equiv.). Después de 30 min más, la mezcla de reacción se dejó enfriar, se filtró para retirar el clorhidrato de trietilamina y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [de *n*-hexano al 60 %/acetato de etilo al 40 % cambiando a *n*-hexano al 55 %/acetato de etilo al 45 %] para dar el producto deseado en forma de un aceite incoloro (0,63 g, 49 %). Datos analíticos: TR 4,50 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1166 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 1164 ([M - H]⁻, 70).

- 30 (ii) (2-(piridin-2-ildisulfanil)etil)-((S)-(pentan-1,5-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de terc-butilo (**12**)

35 Se añadió AcOH/H₂O (3/1) (8 ml) a una solución del compuesto (**11**) (0,37 g, 0,32 mmol, 1 equiv.) en THF (2 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 8 con una solución saturada de NaHCO₃. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml) y los extractos combinados se lavaron con una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml), agua (100 ml) y salmuera saturada (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida. La purificación del residuo por cromatografía en columna ultrarrápida [gradiente de elución de cloroformo/metanol del 0 % al 5 % en incrementos del 1 %] dio el producto en forma de una espuma de color blanco (0,24 g, 81 %). Datos analíticos: TR 3,08 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 938 ([M + H]⁺, 100), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 936 ([M - H]⁻, 100).

- 45 (iii) 11-hidroxi-8-((5-(((11S,11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-10-((2-(piridin-2-ildisulfanil)etoxi)carbonil)-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)-terc-butilo (**13**)

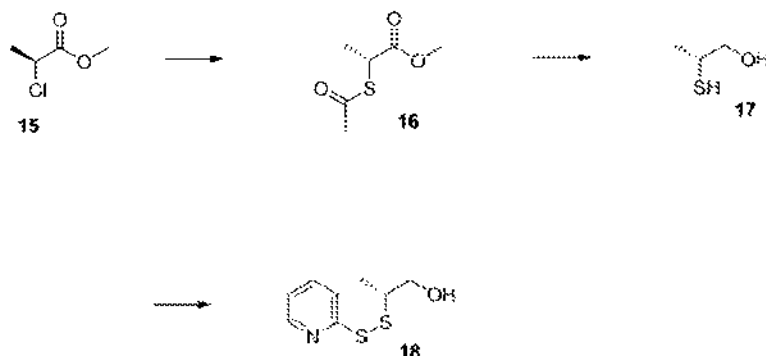
Una solución de DMSO (79 mg, 72 μ l, 1,0 mmol, 4,4 equiv.) en DCM (5 ml) se añadió gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (62 mg, 42 μ l, 0,49 mmol, 2,15 equiv.) en DCM (5 ml) en una atmósfera de argón a -78 °C (hielo seco/acetona). La solución se agitó a -78 °C durante 15 minutos. Se añadió gota a gota una solución de compuesto **(12)** (0,214 g, 0,23 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (6 ml) y la mezcla se agitó a -78 °C durante 45 minutos. Se añadió trietilamina (0,23 g, 0,32 ml, 2,28 mmol, 10 equiv.) y, después de 5 min, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con una solución saturada de NH₄Cl (15 ml) y la porción orgánica se separó, se lavó con una solución 1 M de ácido cítrico (3 x 50 ml), una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml), agua (100 ml) y salmuera saturada (100 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar un aceite de color amarillo pálido. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida dio el producto en forma de una espuma de color blanco (68 mg, 32 %). Datos analíticos: TR 2,90 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 933 ([M + H]⁺, 50), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 935 ([M - H]⁻, 55).

(iv) 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)-2-(piridin-2-ildisulfanil)etilo **(14)**

Una solución fría (baño de hielo) de ácido trifluoroacético al 95 % (1 ml) se añadió al compuesto **13** que se había enfriado en un baño de hielo. La solución se agitó a 0 °C durante 15 minutos, momento en el que se observó mediante CLEM que se había completado. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una mezcla de hielo y solución saturada de NaHCO₃ para neutralizar la solución de ácido trifluoroacético. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 50 ml) y los extractos combinados se lavaron con salmuera saturada (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida para dar el producto en forma de una espuma de color blanco (26 mg, 96 %). Datos analíticos: TR 2,72 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 816 ([M + H]⁺, 70), EM (EN⁻) *m/z* (intensidad relativa) 814 ([M - H]⁻, 40).

Ejemplo 2

(a) (R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol **(18)**



(i) 2-(acetiltio)propanoato de (R)-metilo **(16)**

Se añadió ácido tioacético (1,99 g, 1,86 ml, 26,1 mmol, 1,1 equiv.) a una suspensión de carbonato de cesio (7,73 g, 23,72 mmol, 1,0 equiv.) en DMF seca (40 ml). Después de 30 minutos, se añadió 2-cloropropanoato de (S)-metilo **(15)** y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se repartió entre éter dietílico (150 ml) y agua (150 ml); el agua se separó y se lavó con una porción adicional de éter dietílico (150 ml). Las porciones orgánicas combinadas se lavaron con agua (6 x 100 ml) y salmuera (200 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [acetato de etilo al 10 %/n-hexano al 90 %] dio el producto en forma de un aceite incoloro (3,01 g, 82 %). Datos analíticos: TR 2,25 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 163 ([M + H]⁺, 10), 185 ([M + Na]⁺, 65); $[\alpha]_d^{25} = [+141]^{17,8^\circ\text{C}}_d$ (c, 2,26 CHCl₃).

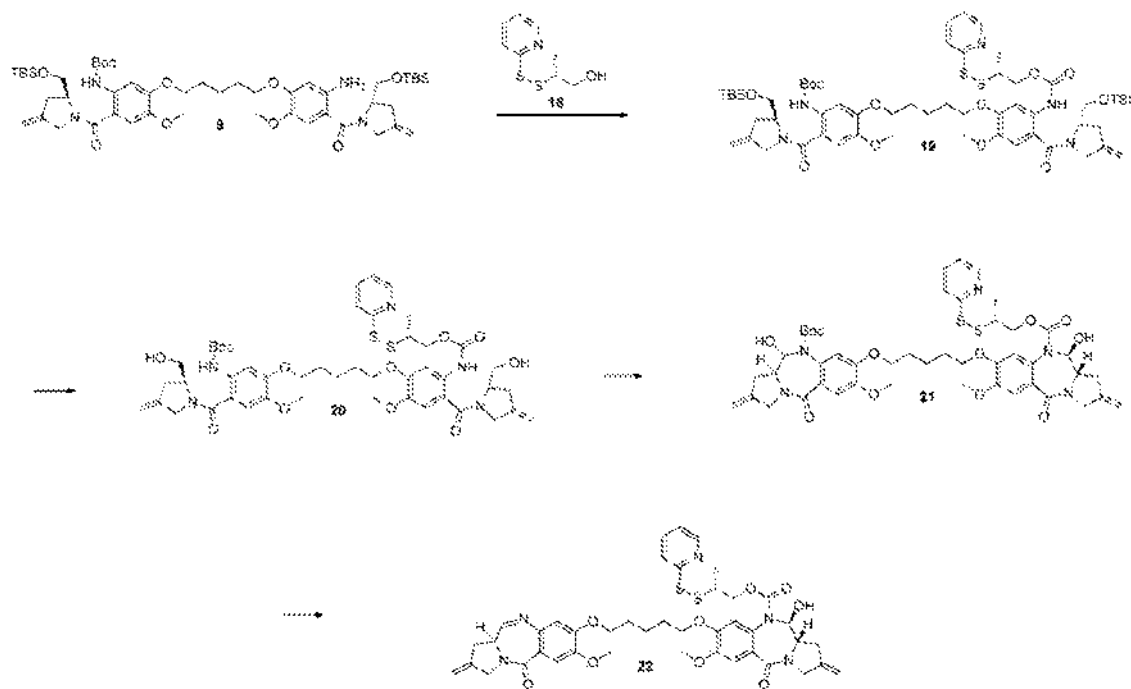
(ii) (R)-2-mercapto-1-propanol **(17)**

Una solución del tioacetato **(16)** (0,57 g, 3,54 mmol, 1,0 equiv.) en THF seco (10 ml) se añadió gota a gota a una suspensión de hidruro de litio y aluminio (0,54 g, 14,15 mmol, 4,0 equiv.) en THF seco (20 ml) a la temperatura de reflujo en una atmósfera de argón. Después de 1 h, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota HCl 2 M manteniendo la temperatura por debajo de 30 °C hasta que cesó la efervescencia. La mezcla resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y después se filtró a través de celite, lavando con THF (40 ml). El disolvente se evaporó; el residuo se disolvió de nuevo en DCM y se secó (MgSO₄). La evaporación del DCM a presión reducida seguida de cromatografía en columna del residuo [n-hexano al 80 %/acetato de etilo al 40 %] dio el producto en forma de un aceite de color amarillo (0,193 g, 58 %). Datos analíticos: $[\alpha]_d^{25} = [-22]^{17,2^\circ\text{C}}_d$ (c, 0,972 CHCl₃).

(iii) **(R)**-2-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (**18**)

Se añadió gota a gota cloruro de sulfurilo (1 M en DCM, 2,0 ml, 2,0 mmol, 1,1 equiv.) a una solución de 2-mercaptopiridina (0,2 g, 1,81 mmol, 1,0 equiv.) en DCM seco (5 ml) a 0 °C en una atmósfera de argón. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y el DCM se evaporó a presión reducida para dar un sólido de color amarillo. El sólido se suspendió en DCM seco (10 ml) y se añadió gota a gota una solución de **(R)**-2-mercaptopropan-1-ol (**17**) (0,18 g, 1,95 mmol, 1,08 equiv.) en DCM seco (5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida para dar una goma de color amarillo. La goma se disolvió de nuevo en agua y la solución se basificó con una solución de hidróxido de amonio, se extrajo con DCM (3 x 50 ml) y los extractos combinados se lavaron con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron para dar un aceite de color amarillo. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [de n-hexano al 80 %/acetato de etilo al 20 % a n-hexano al 60 %/acetato de etilo al 40 % en incrementos del 5 %] dio el producto en forma de un aceite incoloro (0,213 g, 59 %). Datos analíticos: TR 2,43 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 202 ([M + H]⁺, 50); [α]_D²⁵ = [+273]²⁵ (c, 0,28 CHCl₃).

(b) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(((**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**)-**(R)**-2-(piridin-2-ildisulfanil)propilo (**22**)



(i) **(R)**-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil)-((**S**)-(pentan-1,5-diilbis(oxi))bis(2-((**S**)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de *terc-butilo* (**19**)

Se añadió trietilamina (0,28 g, 0,39 ml, 2,8 mmol, 2,2 equiv.) a una solución agitada de la *bis*-anilina mono-boc protegida (**9**) (1,21 g, 1,27 mmol, 1,0 equiv.) y trifosgeno (0,136 g, 0,46 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (15 ml) en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C y, después de 5 minutos, una muestra se trató con metanol y se analizó por CLEM como el carbamato de metilo. Datos analíticos: TR 4,30 min EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 1011 ([M + H]⁺, 100).

Una solución de **(R)**-2-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-ol (**18**) (0,38 g, 1,91 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,19 g, 0,27 ml, 1,91 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (10 ml) se añadió gota a gota al isocianato recién preparado. La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 4 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró para retirar el clorhidrato de trietilamina y el filtrado se evaporó a sequedad para proporcionar el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida [de m-hexano al 60 %/acetato de etilo al 40 % a n-hexano al 40 %/60 % acetato de etilo en incrementos del 5 %] para dar el producto deseado en forma de una espuma de color blanco (0,75 g, 50 %). Datos analíticos: TR 4,50 min; EM (EN⁺) m/z (intensidad relativa) 1180 ([M + H]⁺, 60); [α]_D²¹ = [-18]²¹ (c, 0,28 CHCl₃).

(ii) ((**R**)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propil)-((**S**)-(pentan-1,5-diilbis(oxi))bis(2-((**S**)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de terc-butilo (**20**)

Se añadió ácido acético/H₂O (3/1, 16 ml) a una solución del *bis*-siliil éter (**19**) (0,72 g, 0,61 mmol, 1 equiv.) en THF (4 ml). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 8 con una solución saturada de bicarbonato sódico. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (4 x 150 ml) y los extractos combinados se lavaron con una solución saturada de bicarbonato sódico (2 x 150 ml), agua (150 ml) y salmuera (150 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida dio el producto en forma de una espuma de color blanco (0,56 g, 96 %). Datos analíticos: TR 3,15 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 953 ([M + H]⁺, 100); [α]_D²⁶ = [-13,5]_D²⁶ (c, 0,22 CHCl₃),

(iii) 11-hidroxi-8-((5-(((11**S**,11a**S**)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metilen-5-oxo-10-(((**R**)-2-(piridin-2-ildisulfanilo)propoxi)carbonil)-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirralo[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 (11**S**,11a**S**)-terc-butilo (**21**)

Una solución de DMSO (91 mg, 83 μl, 1,16 mmol, 4,4 equiv.) en DCM anhidro (5 ml) se añadió gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (2,0 M en DCM, 318 μl, 0,635 mmol, 2,4 equiv.) en DCM anhidro (5 ml) a -40 °C en una atmósfera de argón. La solución se agitó a -40 °C durante 15 minutos. Se añadió gota a gota una solución del *bis*-alcohol (**20**) (0,252 g, 0,26 mmol, 1 equiv.) en DCM anhidro (10 ml) y la mezcla resultante se agitó a -40 °C durante 45 minutos. Durante este tiempo, se dejó que la temperatura alcanzara -25 °C. La temperatura se redujo hasta -35 °C y se añadió gota a gota trietilamina (0,27 g, 0,36 ml, 2,6 mmol, 10 equiv.). Después de 5 minutos, se dejó que la temperatura alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se extrajo con una solución 1 M de ácido cítrico (3 x 150 ml), una solución saturada de bicarbonato sódico (150 ml), agua (200 ml) y salmuera (200 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó a presión reducida para dar una espuma de color amarillo. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [cloroformo/metanol del 0 % al 2 % en incrementos del 0,5 %] dio el producto en forma de una espuma de color blanco (0,137 g, 53 %). Datos analíticos: TR 3,17 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 948 ([M + H]⁺, 100); [α]_D²⁶ = [+170]_D²⁶ (c, 0,25 CHCl₃).

(iv) 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 (11**S**,11a**S**)-(R)-2-(piridin-2-ildisulfanil)propilo (**22**)

Una solución fría (baño de hielo) de ácido trifluoroacético al 95 % (8,5 ml) se añadió al compuesto (**21**) (0,221 g, 0,23 mmol, 1 equiv.) que se había enfriado en un baño de hielo. La solución se agitó a 0 °C durante 25 minutos, momento en el que se observó por CLEM que se había completado. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una mezcla de hielo y una solución saturada de bicarbonato sódico (200 ml) para neutralizar la solución de ácido trifluoroacético. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 75 ml) y los extractos combinados se lavaron con agua (100 ml) y salmuera saturada (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a presión reducida para dar el producto en bruto. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [cloroformo/metanol del 0 % al 3 % en incrementos del 1 %] dio el producto en forma de una espuma de color blanco (0,192 g, 99 %). Datos analíticos: TR 3,00 min; EM (EN⁺) *m/z* (intensidad relativa) 830 ([M + H]⁺, 75); [α]_D²² = [+444]_D²² (c, 0,26 CHCl₃).

Ejemplo 3: Determinación de la Citotoxicidad *in vitro*

Células de leucemia mieloide crónica humana K562 se mantuvieron en un medio RPM1 1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y se incubaron con una dosis determinada de fármaco durante 96 horas a 37 °C en la oscuridad. La incubación se terminó mediante centrifugación (5 min, 300 g) y las células se lavaron una vez con medio libre de fármaco. Tras el tratamiento del fármaco apropiado, las células se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (10⁴ células por pocillo, 8 pocillos por muestra). Posteriormente, las placas se mantuvieron en la oscuridad a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂. El ensayo se basa en la capacidad de las células viables para reducir una sal de tetrazolio soluble de color amarillo, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Aldrich-Sigma), a un precipitado de formazán insoluble de color púrpura. Tras la incubación de las placas durante 4 días (para permitir que el número de células de control aumentara en aproximadamente 10 veces), 20 μl de solución de MTT (5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato) se agregaron a cada pocillo y las placas se incubaron adicionalmente durante 5 horas. Las placas se centrifugaron posteriormente durante 5 minutos a 300 g y el grueso del medio se pipeteó del sedimento celular dejando 10-20 μl por pocillo. DMSO (200 μl) se agregó a cada pocillo y las muestras se agitaron para asegurar una mezcla completa. La densidad óptica se leyó posteriormente a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas ELISA Titertek Multiscan, y se construyó una curva de dosis-respuesta. Para cada curva, un valor de CI₅₀ se leyó como la dosis requerida para reducir la densidad óptica final al 50 % del valor de control.

Reducción/Oxidación de los ThioMabs para la Conjugación

Anticuerpos monoclonales producidos por ingeniería de cisteína de longitud completa, (ThioMabs - Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documento US 7521541;

documento US 7723485; documento WO2009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech., 30(2): 184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. . Métodos 332:41-52) expresados en células CHO se redujeron con aproximadamente un exceso de 20-40 veces de TCEP clorhidrato de (tris(2-carboxietil)fosfina o DTT (ditiotreitolo) en Tris 50 mM pH 7.5 con EDTA 2 mM durante 3 hrs a 37 °C o durante la noche a temperatura ambiente. (Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). El TioMab reducido se diluyó y se cargó en una columna HiTrap S en acetato de sodio 10 mM, pH 5, y se eluyó con PBS que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Como alternativa, el anticuerpo se acidificó mediante la adición de 1/20 de volumen de ácido acético al 10 %, se diluyó con succinato 10 mM, pH 5, se cargó en la columna y posteriormente se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de succinato. La columna se eluyó con Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM.

El TioMab eluido y reducido se trató con un exceso molar de 15 veces de DHAA (ácido dehidroascórbico) o sulfato de cobre acuoso 200 nM (CuSO₄). La oxidación de los enlaces disulfuro intercatenarios se completó en aproximadamente tres horas o más. La oxidación con el aire del ambiente también fue eficaz. El anticuerpo reoxidado se dializó en de succinato de sodio 20 mM, pH 5, NaCl 150 mM, DTA 2 mM y se almacenó congelado a -20 °C.

Conjugación de los Tio-Mabs con Compuestos para preparar conjugados anticuerpo-fármaco

Los tio-anticuerpos (TioMab) desbloqueados y reoxidados se hicieron reaccionar con un exceso molar de 6-8 veces de los compuestos anteriores (14, 22) (de una existencia de DMSO a una concentración de 20 mM) en Tris 50 mM, pH 8, hasta que se completó la reacción (16-24 horas) según se determinó mediante el análisis CL-EM de la mezcla de reacción.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) crudos se aplicaron posteriormente a una columna de intercambio catiónico después de la dilución con succinato de sodio 20 mM, pH 5. La columna se lavó con por lo menos 10 volúmenes de columna de succinato de sodio 20 mM, pH 5, y el anticuerpo se eluyó con PBS. Los conjugados anticuerpo-fármaco se formularon en His 20 mM/acetato, pH 5, con sacarosa 240 mM utilizando columnas de filtración de gel. Los conjugados anticuerpo-fármaco se caracterizaron mediante espectroscopia UV para determinar la concentración de proteínas, SEC analítica (cromatografía de exclusión por tamaño) para el análisis de agregación y CL-EM antes y después del tratamiento con lisina endopeptidasa C.

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó utilizando una columna Shodex KW802.5 en fosfato de potasio 0,2 M, pH 6,2 con cloruro de potasio 0,25 mM e IPA al 15 % a un caudal de 0,75 ml/mm. El estado de agregación del conjugado se determinó mediante la integración de absorbancia de área de pico eluido a 280 nm.

Se realizó un análisis CL-EM utilizando un instrumento Agilent QTOF 6520 ESI. Como un ejemplo, un conjugado anticuerpo-fármaco generado utilizando esta química se trató con endoproteinasa Lys-C 1:500 p/p (Promega) en Tris, pH 7,5, durante 30 min a 37 °C. Los fragmentos de escisión resultantes se cargaron en una columna PLRP-S 1000A, 8 um calentada a 80 °C y se eluyeron con un gradiente de 30 % de B a 40 % de B en 5 minutos. La fase móvil A fue H₂O con TFA al 0,05 % y la fase móvil B fue acetonitrilo con TFA al 0,04 %. El caudal fue de 0,5 ml/min. La elución de proteínas se monitoreó mediante detección de la absorbancia UV a 280 nm antes de la ionización por electrospray y análisis de EM. La resolución cromatográfica del fragmento Fc no conjugado, Fab residual no conjugado y Fab con fármaco se obtuvo de manera usual. Los espectros m/z obtenidos se deconvolucionaron utilizando un software Mass HunterTM (Agilent Technologies) para calcular la masa de los fragmentos de anticuerpo.

Como un ejemplo, el peso molecular (PM) para el tio-TMab conjugado con 22 (adición de masa=720 daltons). Masas deconvolucionadas observadas:

- 53.296 daltons corresponde al PM del fragmento Fc no conjugado.
- 47.431 daltons corresponde al PM del fragmento Fab no conjugado.
- 48.150 daltons corresponde al PM del fragmento Fab con fármaco.

De esta manera, el pico observado a 48,150 daltons corresponde al fragmento Fab esperado (47,431 daltons) llevando un fármaco 22 (+720 daltons).

ADC Tio-conjugados con 22

Adición de masa 719,84

Ab	ADC	DAR (relación fármaco a anticuerpo)	Masa observada			
			Ab desnudo	+2 fármacos	Fab desnudo	Fab+ fármaco
Tmab	101	1,6	148121	149580	47431	48150
Tmab	102	1,8	148122	149580	47431	48150
xCD22	103	1,8	149415	150851	48075	48794

Tmab	104	1,9	148122	149571	47431	48150
GFRA1	105	1,8	148916	150360	47828	48546
xGD	106	1,8	149706	151142	48220	48939

ADC Tio-conjugados con 14Adición de masa 705,81

Ab	ADC	DAR	Masa observada			
			Ab desnudo	+2 fármacos	Fab desnudo	Fab+ 1 fármaco
Tmab	110	1,7	148121	149580	47432	48136
Tmab	111	1,8	148122	149580	47432	48135
xCD22	112	1,7	149410	150867	48074	48795

5 os siguientes ensayos *in vitro* e *in vivo* también se describen en Phillips et al (2008) Cancer Res. 68(22):9280-9290.

Ensayo de proliferación celular *in vitro*

10 La eficacia del ADC se midió mediante un ensayo de proliferación celular que emplea el siguiente protocolo (CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485-5488), todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection:

1. Una alícuota de 100 μ l de cultivo celular que contenía aproximadamente 104 células (por ejemplo, KPL-4, una línea celular de cáncer de mama humano, Kurebayashi et al (1999) Brit. Jour. Cancer 79(5-6):707-717), SKBR-3, o MCF7) en un medio se depositó en cada pocillo de una placa de paredes opacas de 96 pocillos.
2. Los pocillos de control se prepararon conteniendo el medio y sin células.
3. El ADC se agregó a los pocillos experimentales y se incubó durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se agregó un volumen de Reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se reportó en gráficas como RLU = unidades relativas de luz.

25 Ciertas células se siembran a 1000-2000/pocillo o 2000-3000/pocillo en una placa de 96 pocillos, 50 μ l/pocillo. Después de uno o dos días, el ADC se agrega en volúmenes de 50 μ l a una concentración final de 9000, 3000, 1000, 333, 111,37, 12,4, 4,1, o 1,4 ng/ml, con pocillos de control "sin ADC" que recibieron medio solo. Las condiciones son por duplicado o triplicado. Después de 3-5 días, se agregan 100 μ l/pocillo de Cell TiterGlo II (ensayo basado en la luciferasa; proliferación medida mediante los niveles de ATP) y los recuentos de células se determinaron utilizando un luminómetro. Los datos se representan en gráficas como la media de la luminiscencia para cada conjunto de réplicas, con barras de error de desviación estándar. El protocolo es una modificación del CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega):

1. Placa de 1000 células/pocillo en 50 μ l/pocillo de medios de FBS/glutamina. Permitir que las células se unan durante la noche.
2. El ADC se diluye en serie 1:3 en los medios iniciando a la concentración de trabajo 18 μ l/ml (esto da como resultado una concentración final de 9 μ l/ml). 50 μ l de ADC diluido se agregan a los 50 μ l de células y medios ya en el pocillo.
3. Incubar de 72-96 horas (el estándar es de 72 horas, pero observar la concentración de 0 μ g/ml para detener el ensayo cuando las células son 85-95% confluentes).
4. Agregar 100 μ l/pocillo de Reactivo Cell Titer Glo Promega, agitar 3 min. y leer en luminómetro.

Resultados

45 Los conjugados anticuerpo-fármaco, trastuzumab-14 (110) y trastuzumab-22 (101) se probaron contra células SK-BR-3, KPL- 4, y MCF-7 (Levenson et al (1997) Cancer Res. 57(15):3071-3078) para medir la viabilidad celular *in vitro* en estudios de cinco días. El valor CI_{50} (μ g/ml) para **101** contra SK-BR-3 fue de 22.12. El valor CI_{50} para **110** contra SK-BR-3 fue de 102.78. Las células SK-BR-3 son células que expresan HER2+, trastuzumab sensible. Ambos **101** y **110** fueron efectivamente inactivos contra MCF-7, que es una línea celular de adenocarcinoma de mama humano que no expresa HER2. Por lo tanto, los conjugados **101** y **110** demuestran potencia de muerte celular dirigida.

Inhibición del crecimiento tumoral, eficacia *in vivo* en explantes de ratones transgénicos que sobreexpresan HER2

5 Los animales adecuados para experimentos transgénicos se pueden obtener de fuentes comerciales estándar tal como Taconic (Germantown, N.Y.). Muchas cepas son adecuadas, pero los ratones hembra FVB se prefieren debido a su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Machos FVB se utilizaron para el apareamiento y sementales CD.1 vasectomizados se utilizaron para estimular la pseudopreñez. Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Los fundadores se cruzan ya sea con ratones FVB o con ratones heterocigotos p53 129/BL6 x FVB. Los ratones con la heterocigosidad en el alelo p53 se utilizaron para aumentar potencialmente la formación de tumores. Sin embargo, esto ha demostrado ser innecesario. Por lo tanto, algunos tumores F1 son de cepas mezcladas. Los tumores de los fundadores son solamente FVB. Seis fundadores fueron obtenidos con algunos tumores en desarrollo sin tener camadas.

15 Los animales que tienen tumores (aloinjerto propagado proveniente de ratones transgénicos con mmtv Fo5) se trataron con una dosis única o múltiple mediante inyección IV de ADC. El volumen del tumor se evaluó a diversos puntos de tiempo después de la inyección.

20 Los tumores surgen fácilmente en ratones transgénicos que expresan una forma activada por mutación de neu, el homólogo de rata de HER2, pero el HER2 que se sobreexpresa en los cánceres de mama humanos no está mutado y la formación tumoral es mucho menos robusta en ratones transgénicos que sobreexpresan HER2 no mutado (Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76).






25 Para mejorar la formación tumoral con HER2 no mutada, los ratones transgénicos se produjeron utilizando un plásmido de ADNc de HER2 en el cual un ATG aguas arriba se eliminó con el fin de evitar la iniciación de la traducción en tales codones ATG aguas arriba, que de otro modo reduciría la frecuencia de iniciación de la traducción desde el auténtico codón de iniciación aguas abajo de HER2 (por ejemplo, véase Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341). Además, se agregó un intrón quimérico al extremo 5', que también debería aumentar el nivel de expresión tal como se reportó en el pasado (Neuberger y Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16:6713; Buchman y Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395; Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:836). El intrón quimérico se deriva de un vector Promega, vector de expresión de mamífero Pci-neo (bp 890-1022). El extremo 3' del ADNc está flanqueado por los exones 4 y 5 de la hormona del crecimiento humana, y secuencias de poliadenilación. Además, se utilizaron ratones FVB porque esta cepa es más susceptible al desarrollo de tumores. El promotor de MMTV-LTR se utilizó para asegurar la expresión específica de HER2 en tejido en la glándula mamaria. Los animales fueron alimentados con la dieta AIN 76A con el fin de aumentar la susceptibilidad a la formación tumoral (Rao et al (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

Modelo de tumor mamario de murino Fo5

40 El modelo Fo5 es un modelo de ratón transgénico en el cual el gen HER2 humano, bajo la regulación transcripcional del promotor del virus de tumor mamario de murino (MMTV-HER2), se sobreexpresa en el epitelio mamario. La sobreexpresión causa el desarrollo espontáneo de tumores mamarios que sobreexpresan el receptor HER2 humano. El tumor mamario de uno de los animales fundadores (fundador #5 [Fo5]) se ha propagado en generaciones posteriores de ratones FVB mediante trasplante en serie de fragmentos de tumor. Antes de ser utilizado para un estudio de eficacia *in vivo*, el tumor mamario transgénico MMTV-HER2 Fo5 se trasplantó quirúrgicamente en la almohadilla de grasa mamaria N.º 2/3 de ratones nu/nu (proveniente de Charles River Laboratories) en fragmentos que medían aproximadamente 2 x 2 mm. Cuando los tumores alcanzaron volúmenes deseados, los ratones portadores de tumores se asignaron al azar y se les dio una dosis única mediante inyección IV del ADC.

Resultados







50 La Figura 1 muestra una representación gráfica del cambio de volumen de tumor medio *in vivo* a través del tiempo en tumores de aloinjerto mamarios de cáncer de mama-modelo MMTV-HER2 Fo5 inoculados en ratones nu/nu CRL después de una administración única iv en el día 0 con: (1) Vehículo acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, (2) xCD22-22 (103) a 10 mg/kg, (3) trastuzumab-22 (101) a 1 mg/kg, (4) trastuzumab-22 (101) a 3 mg/kg, y (5) trastuzumab-22 (101) a 10 mg/kg. Las líneas en la figura se indican con los siguientes símbolos:

-  Vehículo
-  ADC101 Tmab HC A118C, 1 mg/kg
-  ADC101 Tmab HC A118C, 3 mg/kg
-  ADC101 Tmab HC A118C, 10 mg/kg
-  ADC103 CD22 HC A118C, 10 mg/kg

La Figura 2 muestra una representación gráfica del cambio de volumen de tumor medio *in vivo* a través del tiempo en tumores de aloinjerto mamarios de cáncer de mama-modelo MMTV-HER2 Fo5 inoculados en ratones nu/nu CRL

después de una administración única iv en el día 0 con: (1) Vehículo acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, (2) xGD22-14 (112) a 6 mg/kg, (3) trastuzumab-14 (110) a 1 mg/kg, (4) trastuzumab-14 (110) a 3 mg/kg, (5) trastuzumab-14 (110) a 6 mg/kg, y (6) trastuzumab-22 (101) a 1 mg/kg. Las líneas en la figura se indican con los siguientes símbolos:

5

	Vehículo
	ADC101 Tmab HC A118C, 1 mg/kg
	ADC110 Tmab HCA118C, 1 mg/kg
	ADC110 Tmab HC A118C, 3 mg/kg
	ADC110 Tmab HC A118C, 6mg/kg
	ADC112 CD22 HC A118C, 6 mg/kg

Abreviaturas

Ac	acetilo,
Acm	acetamidometilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Boc	bicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
t-Bu	<i>terc</i> -butilo
Bzl	bencilo, en donde Bzl-Ome es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno
Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, en donde Z-Cl y Z-Br son cloro- y bromobenciloxi carbonilo, respectivamente
DMF	N,N-dimetilformamida
Dnp	dinitrofenilo
DTT	ditiotreitolo
Fmoc	9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
imp	grupo protector imina <i>N-10</i> : 3-(2- metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB
MC-OSu	maleimidocaproil-O-N-succinimida
Moc	metoxicarbonilo
MP	maleimidopropanamida
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
PAB	para-aminobenciloxicarbonilo
PEG	etilenoxi
PNZ	carbamato de p-nitrobencilo
Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
TBDMS	<i>terc</i> -butildimetilsililo
TBDPS	<i>terc</i> -butildifenilsililo
Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
Tos	tosilo
Troc	cloruro de 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
Trt	tritilo
Xan	xantilo

10 Referencias

	EP 0522868
	EP 0875569
	EP 1295944
15	EP 1347046
	EP 1394274
	EP 1394274
	EP 1439393
	JP 05003790
20	JP 2004113151
	JP 58180487
	US 2001/055751
	US 2002/034749
	US 2002/042366
25	US 2002/150573
	US 2002/193567
	US 2003/0228319

ES 2 556 584 T3

US 2003/060612
US 2003/064397
US 2003/065143
5 US 2003/091580
US 2003/096961
US 2003/105292
US 2003/109676
US 2003/118592
10 US 2003/119121
US 2003/119122
US 2003/119125
US 2003/119126
US 2003/119128
15 US 2003/119129
US 2003/119130
US 2003/119131
US 2003/124140
US 2003/124579
US 2003/129192
20 US 2003/134790-A1
US 2003/143557
US 2003/157089
US 2003/165504
25 US 2003/185830
US 2003/186372
US 2003/186373
US 2003/194704
US 2003/206918
US 2003/219806
30 US 2003/224411
US 2003/224454
US 2003/232056
US 2003/232350
35 US 20030096743
US 20030130189
US 2003096743
US 2003130189
US 2004/0001827
US 2004/005320
40 US 2004/005538
US 2004/005563
US 2004/005598
US 2004/0101899
US 2004/018553
45 US 2004/022727
US 2004/044179
US 2004/044180
US 2004/101874
US 2004/197325
50 US 2004/249130
US 20040018194
US 20040052793
US 20040052793
US 20040121940
55 US 2005/271615
US 2006/116422
US 4816567
US 5362852
US 5440021
60 US 5583024
US 5621002
US 5644033
US 5674713
US 5700670
65 US 5773223
US 5792616

US 5854399
US 5869445
US 5976551
US 6011146
5 US 6153408
US 6214345
US 6218519
US 6268488
US 6518404
10 US 6534482
US 6555339
US 6602677
US 6677435
US 6759509
15 US 6835807
US 7223837
US 7375078
US 7521541
US 7723485
20 WO 00/012508
WO 00/12507
WO 00/12508
WO 01/16318
WO 01/45746
25 WO 02/088172
WO 03/026577
WO 03/043583
WO 04/032828
WO 2000/12130
30 WO 2000/14228
WO 2000/20579
WO 2000/22129
WO 2000/32752
WO 2000/36107
35 WO 2000/40614
WO 2000/44899
WO 2000/55351
WO 2000/75655
WO 200053216
40 WO 2001/00244
WO 2001/38490
WO 2001/40269
WO 2001/40309
WO 2001/41787
45 WO 2001/46232
WO 2001/46261
WO 2001/48204
WO 2001/53463
WO 2001/57188
50 WO 2001/62794
WO 2001/66689
WO 2001/72830
WO 2001/72962
WO 2001/75177
55 WO 2001/77172
WO 2001/88133
WO 2001/90304
WO 2001/94641
WO 2001/98351
60 WO 2002/02587
WO 2002/02624
WO 2002/06317
WO 2002/06339
WO 2002/101075
65 WO 2002/10187
WO 2002/102235

WO 2002/10382
WO 2002/12341
WO 2002/13847
5 WO 2002/14503
WO 2002/16413
WO 2002/16429
WO 2002/22153
WO 2002/22636
10 WO 2002/22660
WO 2002/22808
WO 2002/24909
WO 2002/26822
WO 2002/30268
15 WO 2002/38766
WO 2002/54940
WO 2002/59377
WO 2002/60317
WO 2002/61087;
20 WO 2002/64798
WO 2002/71928
WO 2002/72596
WO 2002/78524
WO 2002/81646
25 WO 2002/83866
WO 2002/86443
WO 2002/88170
WO 2002/89747
WO 2002/92836
30 WO 2002/94852
WO 2002/98358
WO 2002/99074
WO 2002/99122
WO 2003/000842
WO 2003/002717
35 WO 2003/003906
WO 2003/003984
WO 2003/004989
WO 2003/008537
WO 2003/009814
40 WO 2003/014294
WO 2003/016475
WO 2003/016494
WO 2003/018621
WO 2003/022995
45 WO 2003/023013
WO 2003/024392
WO 2003/025138
WO 2003/025148
WO 2003/025228
50 WO 2003/026493
WO 2003/029262
WO 2003/029277
WO 2003/029421
WO 2003/034984
55 WO 2003/035846
WO 2003/042661
WO 2003/045422
WO 2003/048202
WO 2003/054152
60 WO 2003/055439
WO 2003/055443
WO 2003/062401
WO 2003/062401
WO 2003/072035
65 WO 2003/072036
WO 2003/077836

WO 2003/081210
WO 2003/083041
WO 2003/083047
WO 2003/083074
5 WO 2003/087306
WO 2003/087768
WO 2003/088808
WO 2003/089624
10 WO 2003/089904
WO 2003/093444
WO 2003/097803
WO 2003/101283
WO 2003/101400
15 WO 2003/104270
WO 2003/104275
WO 2003/105758
WO 2003004529
WO 2003042661
20 WO 2003104399
WO 2004/000997
WO 2004/001004
WO 2004/009622
WO 2004/011611
25 WO 2004/015426
WO 2004/016225
WO 2004/020595
WO 2004/022709
WO 2004/022778
30 WO 2004/027049
WO 2004/031238
WO 2004/032828
WO 2004/032842
WO 2004/040000
35 WO 2004/043361
WO 2004/043963
WO 2004/044178
WO 2004/045516
WO 2004/045520
40 WO 2004/045553
WO 2004/046342
WO 2004/047749
WO 2004/048938
WO 2004/053079
45 WO 2004/063355
WO 2004/063362
WO 2004/063709
WO 2004/065577
WO 2004/074320
50 WO 2004000221
WO 2004020583
WO 2004042346
WO 2004065576
WO 2005/023814
55 WO 2005/082023
WO 2005/085251
WO 2006/111759
WO 2007/044515
WO 2007/085930
60 WO 2009/052249
WO 2010/091150
WO 91/02536
WO 92/07574
WO 92/17497
65 WO 94/10312
WO 94/28931
WO 9630514

- WO 97/07198
 WO 97/44452
 WO 98/13059
 WO 98/37193
 5 WO 98/40403
 WO 98/51805
 WO 98/51824
 WO 99/28468
 WO 99/46284
 10 WO 99/58658
 Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)
 Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996 Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499 Amsberry,
 et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867 Angew Chem, Intl. Ed, Engl. (1994) 33:183-186 Annu. Rev. Neurosci.
 21:309-345 (1998)
 15 Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470. 1993 Arai H., et al
 Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992 Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)
 Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995 Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996 Barel M.,
 et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998 Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779 Barnett T., et al Genomics 3,
 59-66, 1988 Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441 Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13 Berge, et al., J.
 20 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., et al Cell 104, 9-19, 2001 Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)
 25 Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997 Brinster et al (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 et al (1981) J. Med. Chem, 24:479-480 Carlsson et al (1978) Biochem. J. 173:723-737 Carter, P. (2006) Nature
 Reviews Immunology 6:343-357 Cell 109 (3):397-407 (2002)
 30 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288 Chakravarty et al (1983) J.
 Med. Chem. 26:638-644 Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991)
 Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341 Cho H.-S., et al Nature 421,756-760, 2003 Ciccociola, A., et al
 EMBO J. 8(7):1987-1991 (1989)
 Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628 Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003
 35 Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen
 independence. The Prostate 2003;55:239-46 Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139 Cree et al
 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404 Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth, 160:81-88 Davis et al (2001) Proc. Natl.
 Acad. Sci
 USA 98(17):9772-9777 de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830 de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int.
 Ed. 42:4490-4494
 40 Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J
 Biol Chem. 277:35035-35043
 Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799
 Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729
 Doronina et al (2006) Bioconj. Chem. 17:114-124
 45 Dubowchik et al. Bioconjugate Chemistry, 2002, 13, 855-869
 Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60
 Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001
 E. Schroder y K. Lübke, The Peptides, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press Ehsani A., et al (1993)
 Genomics 15, 426-429
 50 Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994
 Elshourbagy N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993 Erickson et al (2006) Cancer Res. 66(8): 1-8
 Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582
 Fields, G. y Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluoroenylmethoxycarbonyl amino acids",
 Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214
 55 Fuchs S., et al Mol. Med. 7, 115-124, 2001
 Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125)
 Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000
 Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273)
 Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in Macromolecular Sequencing and Synthesis, Alan R.
 60 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 et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80
 65 Glynne-Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94(2):178-84
 Gregson et al., Chem. Commun. 1999, 797-798

- Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2001,44, 1161-1174
 Gu Z., et al *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000
 Ha et al (1992) *J. Immunol.* 148(5):1526-1531
 Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol* 20, s1-S4, 1992
 5 Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103
 Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070
 Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª Edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU)
 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994 Hara, et al, *J. Antibiotics*, 41.702-704 (1988)
 10 Hashimoto et al (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295
 Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237
 Herdwiijn, P. et al., *Canadian Journal of Chemistry.* 1982, 80, 2903-7
 Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: Nueva York, p 234-242
 Hochlowski, et al., *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)
 15 Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997 Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996
 Horie et al (2000) *Genomics* 67:146-152
 Hubert, R.S., et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 (25):14523-14528)
 Hurley y Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)
 Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002)
 20 *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000)
 Itoh, et al., *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)
 25 *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003)
 Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York
 Jeffrey et al (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358
 Jonsson et al (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413
 Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932
 30 Kang, G-D., et al., *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689
 Kasahara et al (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68
 King et al (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990
 Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447
 Kohler et al (1975) *Nature* 256:495
 35 Kohn, in *Antibiotics III.* Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975).
 Konishi, et al., *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)
 Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121 Kuhns J.J., et al., *Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999 Kuminoto, et al., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)
 Kurebayashi et al (1999) *Brit. Jour. Cancer* 79(5-6):707-717 *Lab. Invest.* 82 (11):1573-1582 (2002)
 40 Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549 Langley y Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)
 Larhammar et al (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
 Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337
 Le et al (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199
 Leber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)
 45 Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)
 Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965)
 Levenson et al (1997) *Cancer Res.* 57(15):3071-3078
 Liang et al (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12
 Manfré, F. et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065
 50 Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597
 McDonagh (2006) *Protein Eng, Design & Sel.*, 19(7): 299-307
 Mendoza et al (2002) *Cancer Res.* 62:5485-5488
 Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861
 Miura et al (1996) *Genomics* 38(3):299-304
 55 Miura et al (1998) *Blood* 92:2815-2822
 Moore M., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 84, 9194-9198, 1987 Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855 Muller et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625 Mungall A.J., et al *Nature* 425, 805-811, 2003 Nagase T., et al (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150)
 Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991 Nakayama et al (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127 Naruse et al (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519 *Nature* 395 (6699):288-291 (1998)
 60 Neuberger y Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713 *Novabiochem Catalog* 2006/2007
 Ogawa Y., et al *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991 Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997 *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995)
Oncogene 14(11): 1377-1382 (1997))
 65 Parrish-Novak J., et al *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002 Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212 Phillips et al (2008) *Cancer Res.* 68(22):9280-9290 Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206 Pletnev S., et al (2003)

- Biochemistry 42:12617-12624 Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2003) 100 (7):4126-4131 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93 (1):136-140 (1996)
 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98 (17):9772-9777 (2001)
 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (26):16899-16903 (2002)
 5 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96 (20):11531-11536 (1999)
 Protective Groups in Organic Synthesis, Greene y Wuts, 3ª Edición, 1999, John Wiley & Sons Inc.
 Puffenberger E.G., et al Cell 79, 1257-1266, 1994
 Rao et al (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158
 Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 1735-1740, 1998
 10 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000 Rodrigues et al
 (1995) Chemistry Biology 2:223 Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553
 S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York
 Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464
 Sakamoto A., Yanagisawa M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991
 15 Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852
 Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82, 6497-6501, 1985
 Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766
 Shamis et al (2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731 Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010 Shimizu,
 et al, J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982)
 20 Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320
 Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815
 Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci
 USA 99:16899-16903
 Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215
 25 Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768
 Svensson P.J., et al Hum. Genet. 103, 145-148, 1998
 Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004
 Syrigos and
 EPenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614
 30 Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)
 Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988 ten Dijke,P., et. al Science 264 (5155):
 101-104 (1994)
 Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001)
 WO 2004/058309 Thurston, et al., Chem, Brit., 26, 767-772 (1990)
 35 Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)
 Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872
 Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847
 Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173
 Trail et al (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337
 40 Tsunakawa. et al., J. Antibiotics, 41. 1366-1373 (1988)
 Tsutsumi M., et al Gene 228, 43-49, 1999
 Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602
 Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002
 Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877
 45 Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76
 Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988
 Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83, 5639-5643, 1986
 Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146
 Wu et al (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145
 50 Xie et al (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291
 Xu, M. J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775
 WO 2004/016225
 Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98 (19):10692-10697 (2001) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2),
 805-808 (1994)
 55 Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986 Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637.

6. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R^7 y R^{17} son ambos OR^{7A} , donde R^{7A} es alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido.
7. El conjugado de la reivindicación 6, en donde R^{7A} es Me.
8. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde X es O.
9. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde R^{11} es H.
10. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde existe un doble enlace entre C2 y C3 en cada unidad monomérica, y en donde R^2 y R^{12} son independientemente R.
11. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 10, en donde R^2 y R^{12} son independientemente arilo C_{5-20} opcionalmente sustituido.
12. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde R^2 y R^{12} se seleccionan independientemente entre =O, =CH₂, =CH-R^D, y =C(R^D)₂.
13. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en donde R^2 y R^{12} son =CH₂.
14. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde R" es un grupo alquileo C₃ o un grupo alquileo C₅.
15. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un antígeno asociado a tumores.
16. El conjugado de la reivindicación 15 en donde en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de superficie celular seleccionados de (1)-(36):
- (1) BMPR1B (receptor tipo IB de proteína morfogenética ósea);
 - (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
 - (3) STEAP1 (antígeno epitelial de transmembrana de seis hélices de la próstata);
 - (4) 0772P (CA125, MUC16);
 - (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina);
 - (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia portadora de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio tipo II);
 - (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B);
 - (8) PSCA hlg (genes 2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12)
 - (9) ETBR (receptor de endotelina tipo B);
 - (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
 - (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado a cáncer de próstata, proteína 1 asociada a cáncer de próstata, antígeno epitelial de transmembrana de seis hélices de próstata 2, proteína de transmembrana de seis hélices de próstata);
 - (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal de catión potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4);
 - (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);
 - (14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus Epstein-Barr) o Hs 73792);
 - (15) CD79b (CD79B, CD79β, IgB (inmunoglobulina-beta asociada), B29);
 - (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje de la fosfatasa que contiene el dominio SH2) SPAP1B, SPAP1C);
 - (17) HER2;
 - (18) NCA;
 - (19) MDP;
 - (20) IL20Rα;
 - (21) Brevican;
 - (22) EphB2R;
 - (23) ASLG659;
 - (24) PSCA;
 - (25) GEDA;
 - (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, BLyS receptor 3, BR3);
 - (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de células B);
 - (28) CD79a (CD79A, CD79α, inmunoglobulina-alfa asociada);

- (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt);
- (30) HLA-D0B (subunidad beta de la molécula MHC clase II (antígeno Ia));
- (31) P2X5 (canal iónico 5 cerrado por ligando del receptor purinérgico P2X);
- (32) CD72 (antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2);
- (33) LY64 (antígeno de linfocito 64 (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR));
- (34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor Fc);
- (35) IRTA2 (translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociada 2); y
- (36) TENB2 (proteoglicano transmembrana putativo).

17. El conjugado de la reivindicación 15 en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo de ingeniería de cisteína.

18. El conjugado de la reivindicación 15 o de la reivindicación 17 en donde el anticuerpo es trastuzumab.

19. El conjugado de la reivindicación 15 o de la reivindicación 17 en donde Ab es un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-Steap1 o un anticuerpo anti-CD22.

20. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 15 en donde la carga de fármacos (p) de fármacos (D) a un anticuerpo (Ab) es un número entero de 1 a aproximadamente 8.

21. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 20 que comprende una mezcla de los compuestos conjugados anticuerpo-fármaco, en donde la carga de fármacos promedio por anticuerpo en la mezcla de compuestos conjugados anticuerpo-fármaco es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5.

22. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para su uso en terapia.

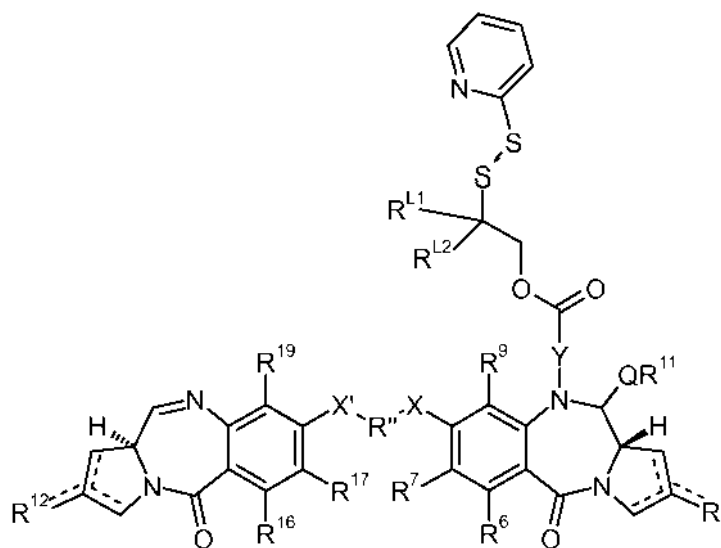
23. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

24. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la enfermedad es cáncer.

25. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25 que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico.

27. Un compuesto de fórmula (E):



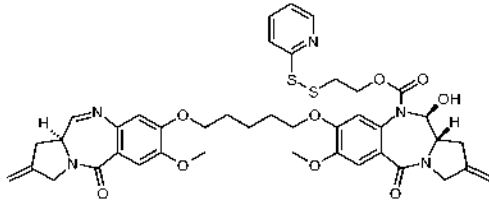
D

y sales y solvatos de los mismos, en donde

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

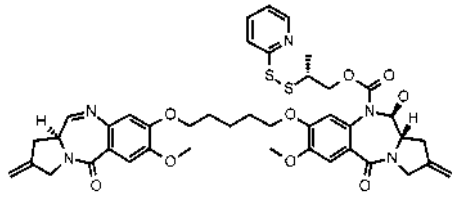
R², R⁶, R⁷, R⁹, R¹², R¹⁶, R¹⁷, R¹⁹, X, X', Rⁿ, Y, R^{L1} y R^{L2} son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

28. El compuesto de la reivindicación 27, que es:



5

29. El compuesto de la reivindicación 27, que es:



10 30. Un método para preparar un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el método la etapa de hacer reaccionar un agente de unión celular con el compuesto (D) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29.

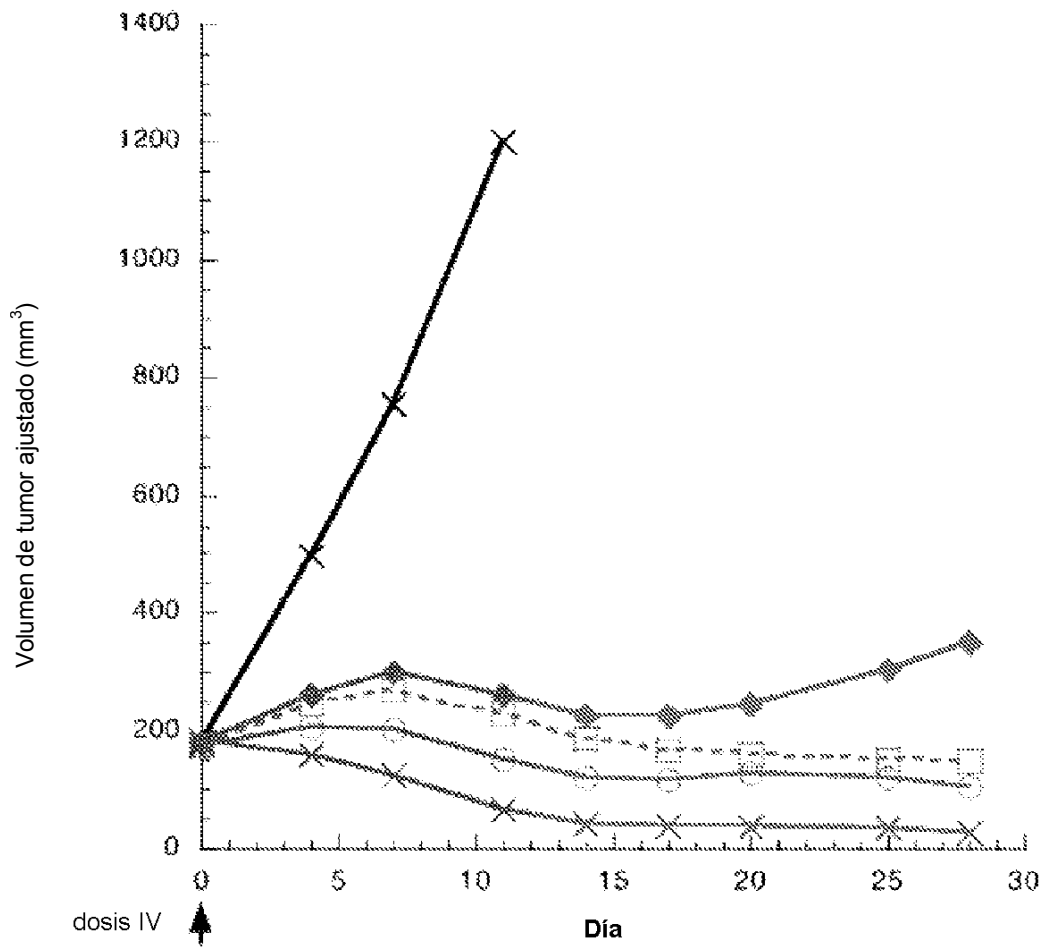


Fig. 1

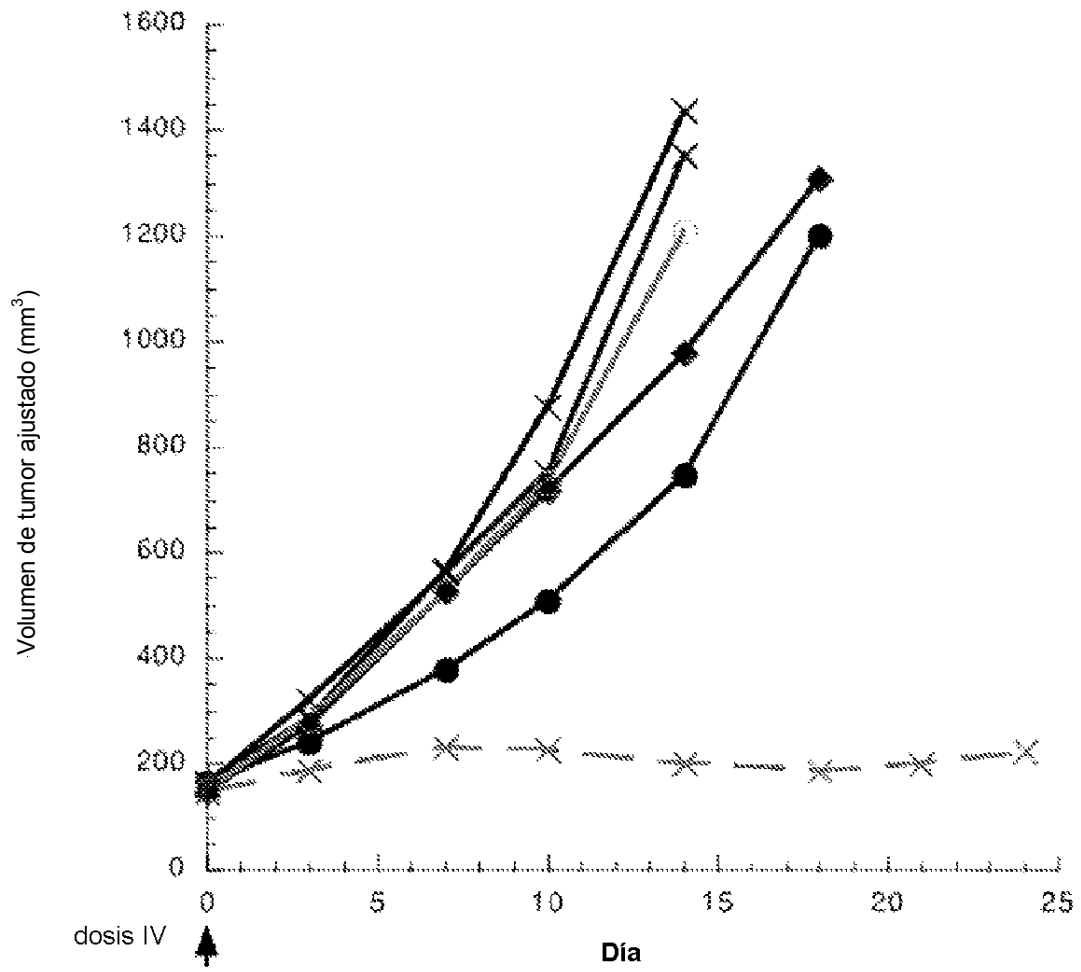


Fig. 2