

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 418**

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: **15.02.2012 E 12705600 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2675479**

54 Título: **Derivados citotóxicos de benzodiazepina**

30 Prioridad:

15.02.2011 US 201161443062 P

15.02.2011 US 201161443092 P

06.05.2011 US 201161483499 P

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

22.04.2016

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)

830 Winter Street

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

LI, WEI;

MILLER, MICHAEL;

FISHKIN, NATHAN y

CHARI, RAVI V. J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 567 418 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

Derivados citotóxicos de benzodiazepina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con nuevos compuestos citotóxicos, y conjugados citotóxicos que comprenden estos compuestos citotóxicos y agentes de unión celular. Más específicamente esta invención se relaciona con los derivados de estos nuevos compuestos de benzodiazepina, sus intermediarios, sus conjugados, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que son útiles como medicamentos, en particular como agentes anti-proliferativos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los derivados de benzodiazepina son compuestos útiles para tratar varios trastornos, e incluyen medicamentos tales como, antiepilépticos (imidazo [2,1-b][1,3,5] benzotiadiazepinas, Pat. U.S. No. 4,444,688; Pat. U.S. No. 4,062,852), antibacterianos (pirimido[1,2-c][1,3,5]benzotiadiazepinas, GB 1476684), diuréticos e hipotensivos (pirrolo(1,2-b)[1,2,5]benzotiadiazepina 5,5 dióxido, Pat. U.S. No. 3,506,646), hipolipidémicos (WO 03091232), anti-depresivos (Pat. U.S. No. 3,453,266); osteoporosis (JP 2138272).

20 WO 2010/091150 A1 (ImmunoGen, Inc.) describe derivados de benzodiazepina con actividad antiproliferativa, dímeros citotóxicos de dichos compuestos y conjugados de los monómeros y los dímeros y a composiciones y métodos que implican el uso de los mismos.

25 Recientemente, se mostró en modelos de tumor animal que los derivados de benzodiazepina, tales como las pirrolobenzodiazepinas (PBD) actúan como agentes anti-tumorales (N-2-imidazolil alquil sustituido 1,2,5-benzotiadiazepina-1,1-dióxido, Pat. U.S. No. 6,156,746), benzo-pirido o dipirido tiadiazepina (WO 2004/069843), pirrolo [1,2-b] [1,2,5] benzotiadiazepinas y derivados de pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzodiazepina (WO2007/015280), derivados de tomamicina (*por ejemplo*, pirrolo[1,4]benzodiazepinas), tales como los descritos en WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, y EP 2019104, Se conoce también que las benzodiazepinas afectan el crecimiento y diferenciación celular (Kamal A., *et al.*, Bioorg Med Chem. 2008 ago 15;16(16):7804-10 (y las referencias citadas en ella); Kumar R, Mini Rev Med Chem. 2003 jun;3(4):323-39 (y las referencias citadas en ella); Bednarski J J, *et al.*, 2004; Sutter A. P, *et al.*, 2002; Blatt N B, *et al.*, 2002), Kamal A. *et al.*, Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J. Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al.*, Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. y Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465; y Tozuka, Z., *et al.*, Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708, La estructura general de las PBD se describe en la Publicación US Número 20070072846, Las PBD difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. Sus capacidad para formar un aducto en la hendidura menor y entrecruzar el ADN les permite interferir en el procesamiento del ADN, de ahí su potencial para usarse como agentes antiproliferativos.

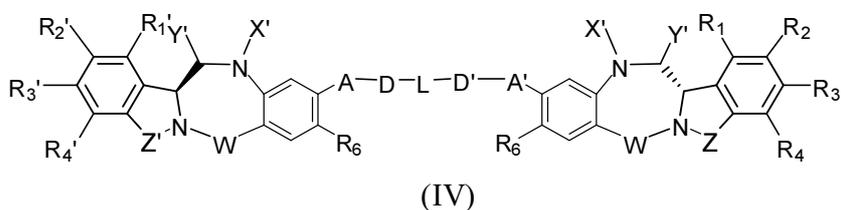
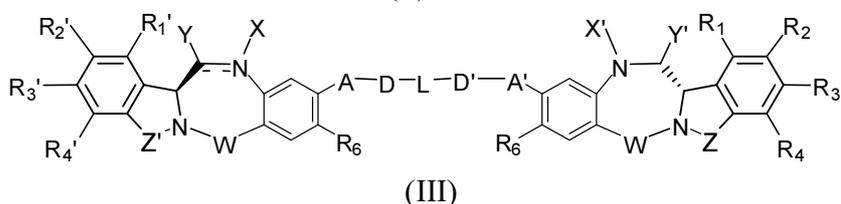
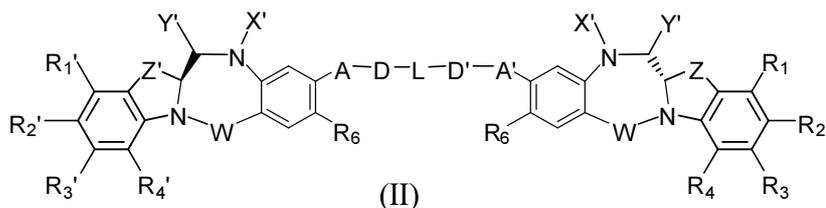
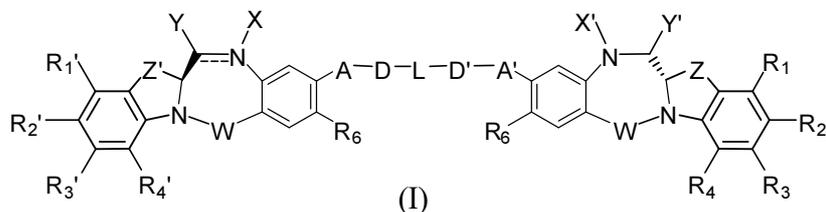
45 La primera pirrolobenzodiazepina a introducir en la clínica, SJG-136 (NSC 694501) es un agente citotóxico potente que causa entrecruzamientos inter-cadena de ADN (S.G Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *et al.*, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould *et al.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509). Los resultados de una evaluación clínica de Fase I de SJG-136 revelaron que este fármaco fue tóxico a dosis extremadamente bajas (dosis máxima tolerada de 45 µg/m², y se observaron varios efectos adversos, incluyendo síndrome de escape vascular, edema periférico, toxicidad hepática y fatiga. El daño de ADN se observó en todas las dosis en los linfocitos circulantes (D. Hochhauser *et al.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147). Por lo tanto, existe una necesidad de derivados de benzodiazepina mejorados que sean menos tóxicos y aún terapéuticamente activos para tratar una variedad de estados patológicos proliferativos, tales como cáncer.

50 **Sumario de la invención**

55 Los dímeros citotóxicos de benzodiazepina descritos en la técnica poseen dos iminas funcionales en sus formas libres o formas reversiblemente protegidas, tales como un hidrato, alcoxilato o sulfonato. La presencia de estas dos iminas funcionales resulta en el entrecruzamiento del ADN (S.G. Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748). La presente invención se basa parcialmente en el hallazgo inesperado de que conjugados del agente de unión celular de nuevos derivados citotóxicos de benzodiazepina, tales como dímeros de indolinobenzodiazepeno que están desprovistos de dos iminas funcionales (*por ejemplo*, una imina funcional y una amina funcional), y son incapaces así de entrecruzarse con el ADN, muestran un índice terapéutico mucho más alto (relación de dosis máxima tolerada para dosis mínima efectiva) *in vivo* en comparación con los derivados de benzodiazepina que pueden entrecruzarse con el ADN que se describen previamente en la técnica.

65 Así un objetivo de la invención es proporcionar el compuesto citotóxico que comprende un grupo de enlace con un grupo reactivo unido a éste capaz de enlazar covalentemente el compuesto citotóxico a un agente de unión celular

(CBA, ver más abajo), en donde el compuesto citotóxico se representa por cualquiera de las siguientes fórmulas:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o un resto protector de amina;

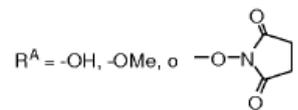
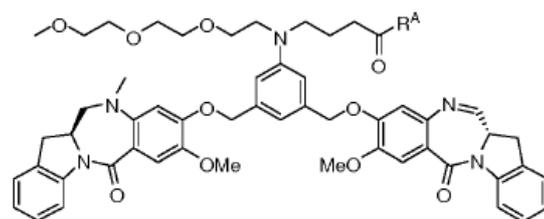
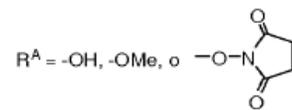
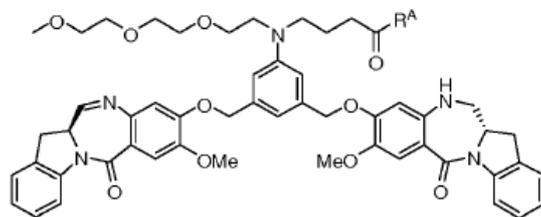
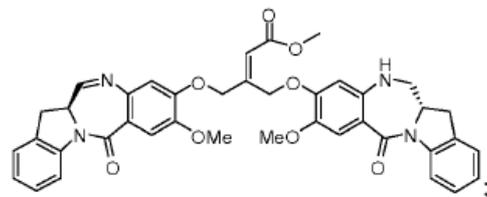
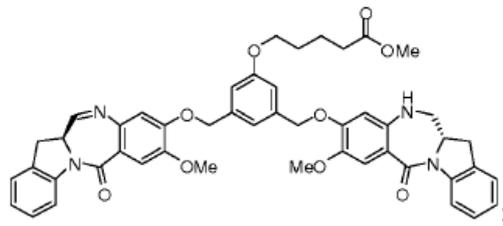
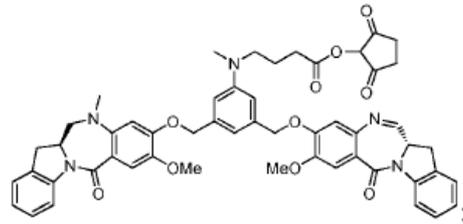
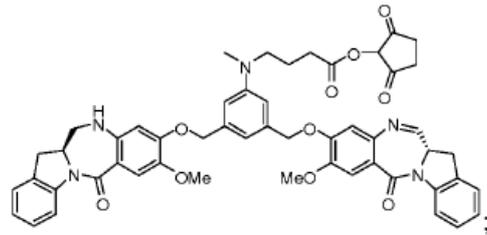
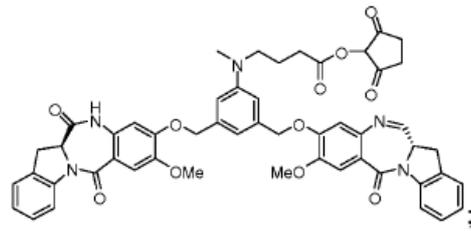
10 Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOR', -OCOR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido; o,

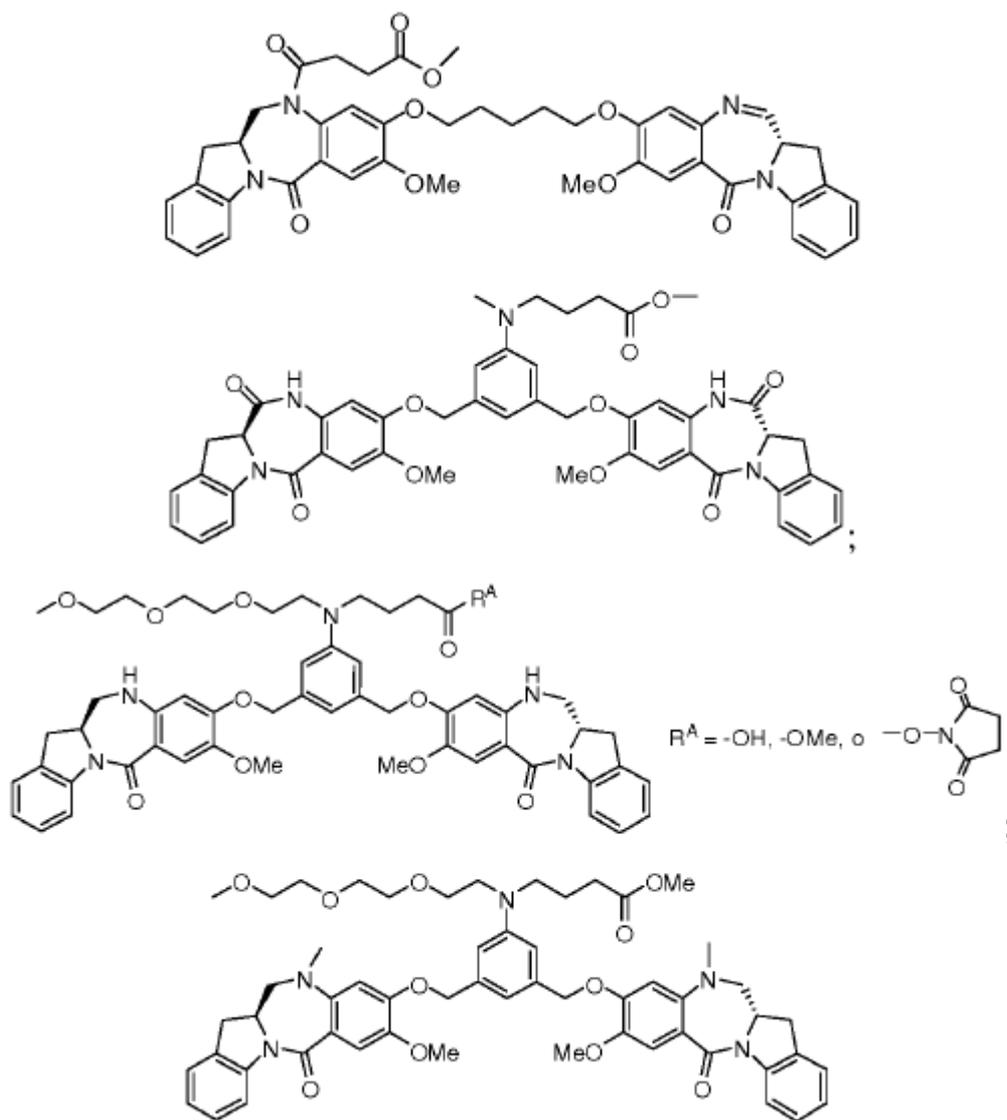
15 Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiosulfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fósforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de éstos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(R^j)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; R^j puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo; preferentemente, Y es un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito o un metabisulfito, o sales de éstos (tal como sal sódica);

M es -H o un catión;

30 R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de

- polietilenglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 5 R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 10 R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;
- n es un número entero de 1 a 24;
- W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO y SO₂;
- 15 X' se selecciona de -H, un grupo protector amina, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 20 Y' se selecciona de -H, un grupo oxo, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos;
- 25 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$, halógeno, guanidinio $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -
- 30 OCOR', -OCONR'R'' y el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;
- R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;
- Z y Z' se seleccionan independientemente de $-(\text{CH}_2)_{n-}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2)_{na-}$, $-(\text{CH}_2)_{n-}\text{NR}_9\text{-(CH}_2)_{na-}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{-O-(CH}_2)_{na-}$ y $-(\text{CH}_2)_{n-}\text{S-(CH}_2)_{na-}$;
- 35 n' y na' son iguales o diferentes, y son seleccionados de 0, 1, 2 y 3;
- R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se selecciona cada uno independientemente de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-}$, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;
- 40 R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-}$;
- A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ y -CRR'N(R₅)-;
- R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- 45 D y D' son iguales o diferentes, y están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-}$;
- L está ausente, es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-}$, un alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alquenilo está opcionalmente sustituido con el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, siempre que el compuesto no es uno de los compuestos descritos inmediatamente a continuación.
- 50
- 55 El compuesto no es ninguno de los compuestos siguientes:



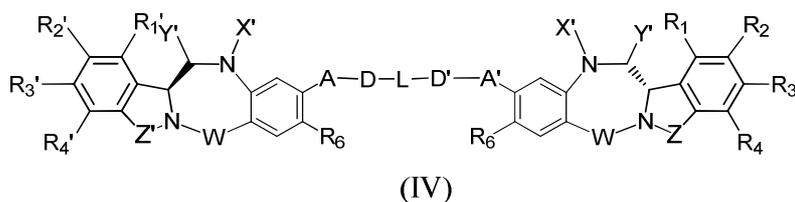
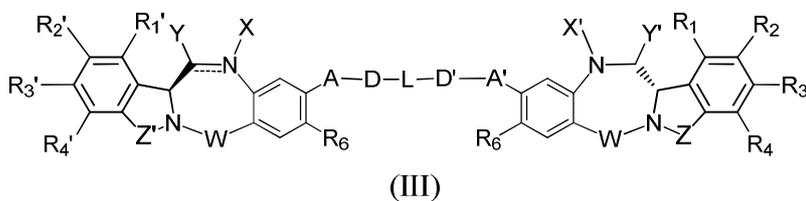
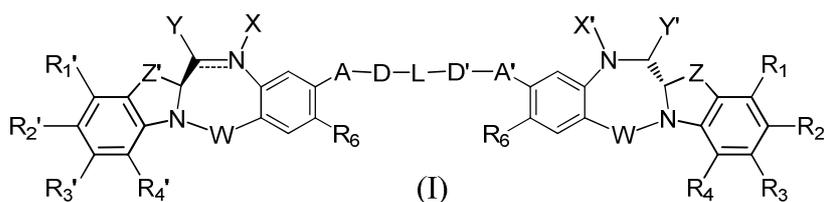


En ciertas realizaciones, X no es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. En ciertas realizacionesrealizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

5 En ciertas realizacionesrealizaciones, Y es un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, *etc.*), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido.

15 Un segundo objetivo de la invención es proporcionar conjugados de agentes de unión celular con los nuevos compuestos de benzodiazepina o derivados de éstos de la presente invención. Estos conjugados son útiles como agentes terapéuticos, los cuales se administran específicamente a las células dianas y son citotóxicos.

20 Específicamente, un conjugado de la invención puede comprender: un compuesto citotóxico y un agente de unión celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico comprende un grupo de enlace que une covalentemente el compuesto citotóxico al CBA, y en donde el compuesto citotóxico se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

5

la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace, o un resto protector de amina;

Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR',
 10 -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido; o,

Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiofosfato (PO₃SH₃, PO₃S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fósforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de éstos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(Rⁱ)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; Rⁱ puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo; preferentemente, Y es un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito o un metabisulfito, o sales de éstos (tal como sal sódica);

M es -H o un catión;

R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

R' y R'' se selecciona cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂,
 -COR, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol

-(CH₂CH₂O)_n-R^c, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace;

n es un número entero de 1 a 24;

W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO y SO₂;

X' se selecciona de -H, un grupo protector amina, el grupo de enlace, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo

45

heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

5 Y' se selecciona de -H, un grupo oxo, el grupo de enlace, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un anillo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos;

10 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halógeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -CONR'R'' y el grupo de enlace;

15 R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno o el grupo de enlace;

Z y Z' se seleccionan independientemente de $-(CH_2)_{n^-}$, $-(CH_2)_{n^-}-CR_7R_8-(CH_2)_{na^-}$, $-(CH_2)_{n^-}-NR_9-(CH_2)_{na^-}$, $-(CH_2)_{n^-}-O-(CH_2)_{na^-}$ y $-(CH_2)_{n^-}-S-(CH_2)_{na^-}$;

n' y na' son iguales o diferentes, y se seleccionan de 0, 1, 2 y 3;

20 R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se selecciona cada uno independientemente de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

25 A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo $(-C(=O)-)$, -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ y -CRR'N(R₅)-;

R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

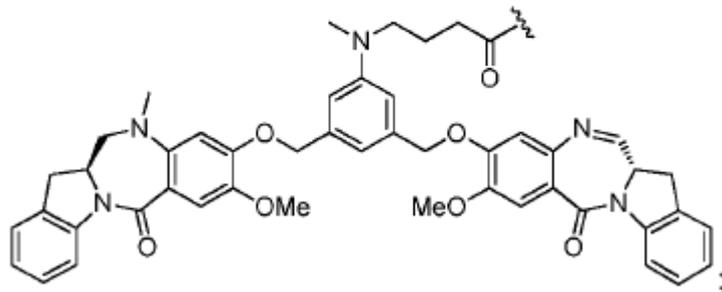
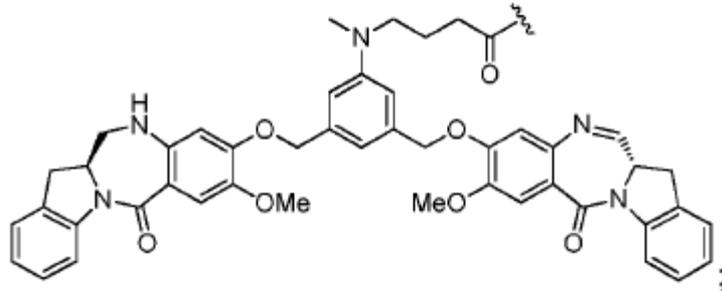
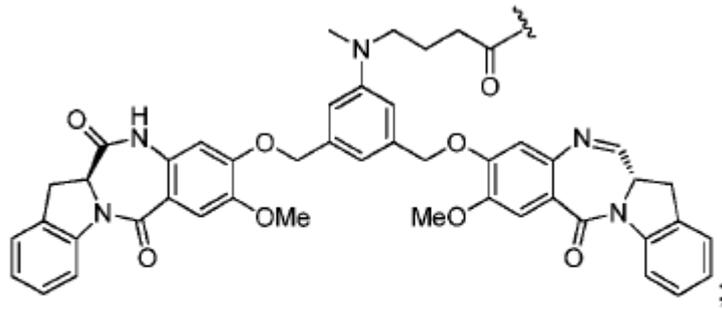
D y D' son iguales o diferentes, y están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de

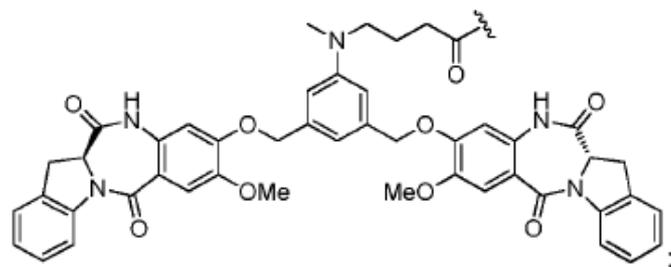
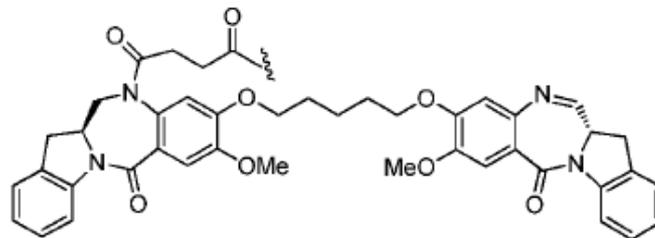
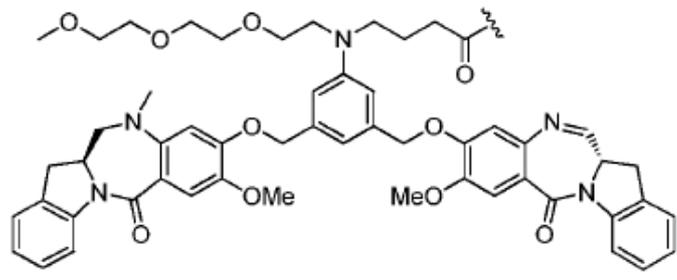
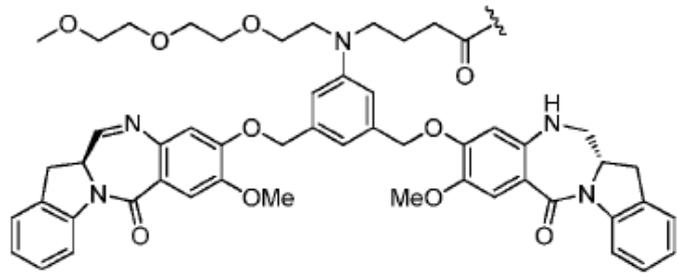
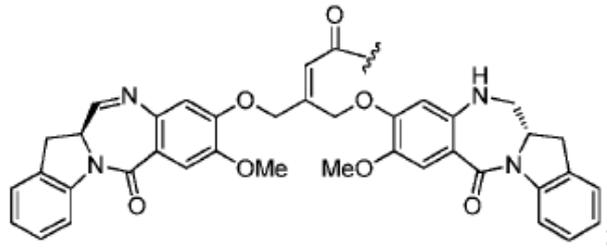
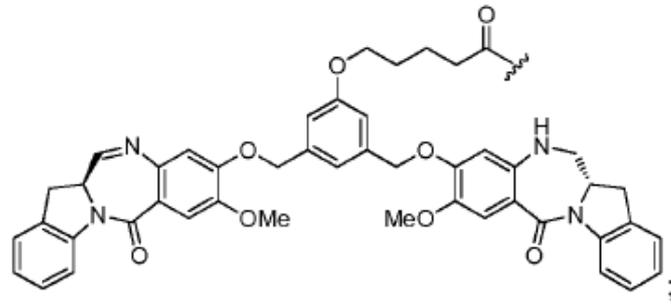
30 carbono, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

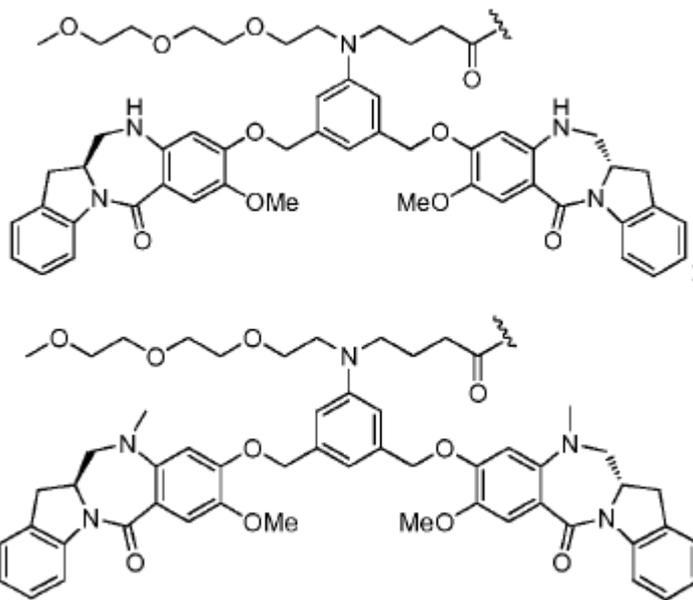
L está ausente, es el grupo de enlace, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, un alquilo o alqueno lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alqueno está opcionalmente sustituido con el grupo de

35 enlace; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace, en donde el compuesto no es uno de los descritos inmediatamente a continuación.

El compuesto del conjugado no es ninguno de los compuestos siguientes (el enlace ondulado representa el enlace a través del cual el compuesto se une al CBA):







En ciertas realizaciones, X no es el grupo de enlace. En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

5

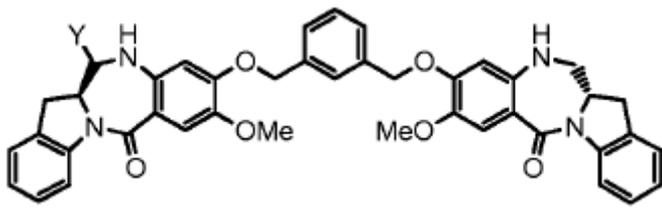
En ciertas realizaciones, Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido. En ciertas realizaciones, Y no es -H.

10

La presente invención incluye además una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende nuevos compuestos de benzodiazepina, derivados de éstos, o conjugados de éstos, (y/o solvatos, hidratos y/o sales de éstos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable). La presente invención incluye además una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende nuevos compuestos de benzodiazepina, derivados de éstos, o conjugados de éstos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de éstos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable), y que además comprende un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir crecimiento anormal de la célula o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (por ejemplo, ser humano). Las presentes composiciones son útiles para tratar afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, deficiencia inmune tal como el SIDA, y enfermedades inflamatorias en un mamífero (por ejemplo, ser humano).

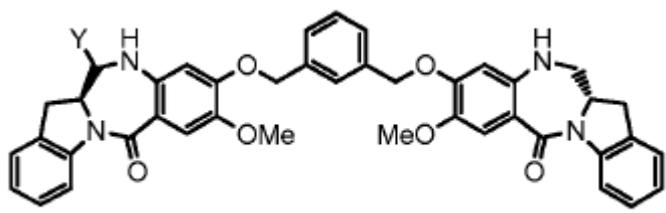
25

La presente invención también incluye un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11-22, o un compuesto representado por la fórmula siguiente:



30

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H, o un catión farmacéuticamente aceptable de éste, para uso como un medicamento. La presente invención también incluye un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11-22, o un compuesto representado por la fórmula siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H, o un catión farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en un método para inhibir el crecimiento anormal de la célula o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmune, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad renal en un mamífero (*por ejemplo*, ser humano) que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de los nuevos compuestos de benzodiazepina, derivados de éstos, o conjugados de éstos, (y/o solvatos y sales de éstos) o una composición de éstos, sola o en conjunto con un segundo agente terapéutico. También se describe en la presente memoria un método para sintetizar y usar los nuevos compuestos de benzodiazepina, derivados de éstos, y conjugados de éstos para el diagnóstico *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* o tratamiento de células de mamíferos, organismos, o condiciones patológicas asociadas.

Los compuestos de esta invención, derivados de éstos, o conjugados de éstos, y composiciones que los comprenden, son útiles para tratar o disminuir la gravedad de los trastornos, tales como, caracterizado por el crecimiento anormal de células (*por ejemplo*, cáncer). Otras aplicaciones de compuestos y conjugados de esta invención incluyen, pero sin limitarse a, tratar afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, deficiencia inmune tal como el SIDA y enfermedades inflamatorias en un mamífero (*por ejemplo*, ser humano).

Como se usa en la presente, cuando se hace referencia a un grupo (*por ejemplo*, R^c, L, X' etc.) "es/ser" (o "no es") el grupo de enlace o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, significa que el grupo "comprende" (o "no comprende") el grupo de enlace o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste.

Breve descripción de las figuras

Las FIGS. 1-6 muestran los esquemas de reacción para la síntesis de compuestos de benzodiazepina y los compuestos enlazadores correspondientes adecuados para la conjugación de la presente invención.

La FIG. 7 muestra el esquema de reacción para la síntesis de compuestos representativos con enlazadores de PEG modificados de la presente invención.

La FIG. 8 muestra el esquema de reacción para la síntesis de compuestos representativos con un enlazador metiltio de la presente invención.

Las FIG. 9-10 muestran los esquemas de reacción para la síntesis de compuestos representativos que contienen una amina terciaria de la presente invención.

La FIG. 11 muestra el esquema de reacción para la síntesis de compuestos representativos con un péptido enlazador de la presente invención.

Las FIG. 12-19 muestran los esquemas de reacción para la síntesis de compuestos representativos adecuados para los métodos de conjugación en una etapa de la presente invención.

La FIG. 20 muestra el esquema de reacción para una síntesis de dímero de mono-imina en dos etapas.

La FIG. 21 muestra el esquema de reacción para una síntesis de dímero di-reducido en dos etapas.

La FIG. 22 muestra los esquemas para la síntesis en una etapa de los conjugados representativos anticuerpo-fármaco.

La FIG. 23 muestra los esquemas para la síntesis en dos etapas de los conjugados representativos anticuerpo-fármaco.

La FIG. 24 muestra la citotoxicidad *in vitro* del dímero metiltio **1d** contra las líneas celulares Namalwa, KB y HL60/QC.

La FIG. 25 muestra la citotoxicidad *in vitro* y especificidad de conjugados huMy9-6-SPDB-**1f** contra diversas líneas celulares. Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.

La FIG. 26 muestra la citotoxicidad *in vitro* y especificidad de los conjugados huFOLR1-SPDB-**1f**.

La FIG. 27 muestra que la conjugación de los dímeros no reduce la afinidad de la unión del anticuerpo. Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.

La FIG. 28 muestra la actividad antitumoral *in vivo* del conjugado de huMy9-6, Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.

La FIG. 29 muestra la citotoxicidad *in vitro* del conjugado huMy9-6-SPDB-**1f** contra las células positivas al antígeno. Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.

La FIG. 30 muestra el esquema de reacción sintética para preparar los disulfuros enlazadores que contienen tioéter **27e-h**.

La FIG. 31 muestra el esquema de reacción sintética para preparar los dímeros **28c-f**.

La FIG. 32 muestra esquema de reacción sintética para preparar los dímeros enlazados al fenilo **29b-c**.
 La FIG. 33 muestra el esquema de reacción para una síntesis alternativa en dos etapas de dímeros mono-imina.
 La FIG. 34 muestra la citotoxicidad *in vitro* de huMy9-6-SPDB-1f (A), huMy9-6-sulfoSPDB-1f (B) y huMy9-6-BMPS-1f (C) contra células HL60/QC (Ag⁺) con y sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno. Obsérvese que en todos los tres experimentos (34A, 34B, y 34C), se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 La FIG. 35 muestra la citotoxicidad *in vitro* de chB38.1-SPDB-1f (A), y chB38,1-sulfoSPDB-1f (B) contra las células COLO205 (Ag⁺). Obsérvese que en ambos experimentos, se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 La FIG. 36 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-1f en ratones que portan HL60/QC. Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación.
 La FIG. 37 muestra la eficacia *in vivo* de huFOLR1-SPDB-1f en ratones que portan tumor KB.
 La FIG. 38 muestra el esquema de síntesis del compuesto **1**,
 La FIG. 39 muestra un esquema de síntesis del compuesto **1d** con 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).
 La FIG. 40 muestra un esquema de síntesis del compuesto **1d** con triacetoxiborohidruro sódico (STAB).
 La FIG. 41 muestra un esquema de síntesis del compuesto **31a-c**.
 La FIG. 42 muestra un esquema de síntesis del compuesto **32c,d**.
 La FIG. 43 muestra un esquema de síntesis de los compuestos **1i** y **12a**.
 La FIG. 44 muestra actividad antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-sulfoSPDB-1f, y (C) huMy9-6-BMPS-1f, contra células OCI-Aml3 (Ag⁺) con y sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno. Obsérvese que en todos los experimentos, se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 FIG. 45 muestra un esquema alternativo para sintetizar el ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico usado en la preparación del monómero IBD.
 La FIG. 46 es un esquema alternativo de síntesis para (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (**1b**).
 La FIG. 47 es un esquema alternativo de síntesis para (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (**1b**).
 La FIG. 48 es un esquema alternativo de reacción sintética para una síntesis en dos etapas de dímero de mono-imina.
 La FIG. 49 muestra la potencia de diversos conjugados contra diversas líneas celulares. Los valores CI₅₀ listados en la tabla se encuentran en la unidad de nM.
 La FIG. 50 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13.
 FIG. 51 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor NB4.
 La FIG. 52 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor HL60/QC.
 La FIG. 53 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13, Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 La FIG. 54 muestra un esquema representativo de la síntesis de un conjugado folato sulfonado / compuesto citotóxico.
 La FIG. 55 muestra varios conjugados representativos fármaco-anticuerpo sulfonados con diferentes enlazadores.
 La FIG. 56 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-Fármaco **2** en ratones que portan el tumor HL60/QC. Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 La FIG. 57 muestra la eficacia *in vivo* de huMy9-6-Fármaco **2** en ratones que portan el tumor MOLM-13, Obsérvese que se adicionó bisulfito de sodio a la reacción de conjugación para preparar el conjugado.
 La FIG. 58 muestra la citotoxicidad *in vitro* similar de los conjugados HuMy9-6 (-Fármaco **2** preparados sin y con bisulfito de sodio contra las células HL60 que expresan el antígeno CD33,
 La FIG. 59 muestra la citotoxicidad *in vitro* similar de los conjugados anti-CD22 Ab-Fármaco **2** preparados sin y con bisulfito de sodio contra las células BJAB que expresan el antígeno CD22.
 La FIG. 60 muestra la preparación de huMy9-6-sulfo-SPDB-1d usando el enlazador altamente reactivo 4-nitroPy-sulfo-SPDB.

Descripción detallada de la invención

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas que se acompañan.

Se debe entender que cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, que incluyen aquellas descritas bajo diferentes aspectos de la invención (*por ejemplo*, compuestos, moléculas enlazadoras de compuestos, conjugados, composiciones, métodos para preparar y usar) y partes diferentes de la especificación (que incluyen realizaciones descritas sólo en los Ejemplos) pueden combinarse con una o más realizaciones distintas de la invención, a menos que sea negado o inadecuado. La combinación de las realizaciones no se limita a las combinaciones específicas reivindicadas a través de las reivindicaciones multidependientes.

65

DEFINICIONES

“**Alquilo lineal o ramificado**” como se usa en la presente se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a veinte átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero sin limitarse a, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo, 1-octilo, y similares. Preferentemente, el alquilo tiene de uno a diez átomos de carbono. Con mayor preferencia, el alquilo tiene uno a cuatro átomos de carbono.

“**Alquenilo lineal o ramificado**” se refiere un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, *es decir*, un enlace doble carbono-carbono, en donde el radical alquenilo incluye radicales que tienen orientaciones “cis” y “trans”, o alternativamente, orientaciones “E” y “Z”. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, etilenilo o vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), y similares. Preferentemente, el alquenilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Con mayor preferencia, el alquilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

“**Alquinilo lineal o ramificado**” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, *es decir*, un enlace triple carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo, y similares. Preferentemente, el alquinilo tiene dos a diez átomos de carbono. Con mayor preferencia, el alquinilo tiene dos a cuatro átomos de carbono.

El término “**carbociclo**”, “**carbociclilo**” y “**anillo carbocíclico**” se refiere a un anillo monovalente no aromático, saturado o parcialmente insaturado que tiene 3 a 12 átomos de carbono como un anillo monocíclico ó 7 a 12 átomos de carbono como un anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen 7 a 12 átomos pueden disponerse, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tiene 9 ó 10 átomos anulares pueden disponerse como un sistema biciclo [5,6] o [6,6], o como sistemas puenteados tales como biciclo[2,2,1]heptano, biciclo[2,2,2]octano y biciclo[3,2,2]nonano. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero sin limitarse a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclohexadecilo, y similares.

Los términos “**alquilo cíclico**” y “**cicloalquilo**” se pueden usar indistintamente. Éstos se refieren a un radical de anillo carbocíclico saturado monovalente. Preferentemente, el alquilo cíclico es un radical de anillo monocíclico de 3 a 7 miembros. Con mayor preferencia, el alquilo cíclico es ciclohexilo.

El término “**alquenilo cíclico**” se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace doble en la estructura anular.

El término “**alquinilo cíclico**” se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace triple en la estructura anular.

“**Arilo**” significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivados al eliminar un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema anular aromático parental. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ilustrativas como “Ar.” Arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado, o anillo heterocíclico o carbocíclico o aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitarse a, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, y similares. Preferentemente, el arilo es un grupo fenilo.

Los términos “**heterociclo**”, “**heterociclilo**”, y “**anillo heterocíclico**” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un radical carbocíclico saturado o uno parcialmente insaturado (*es decir*, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a 18 átomos anulares en el cual al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo, y azufre, los átomos anulares restantes son C, donde uno o más átomos anulares está opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos más abajo. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros anulares (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S) o uno biciclo que tiene 7 a 10 miembros anulares (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566, “**Heterociclilo**” incluye además radicales donde los radicales heterociclo se fusionan con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o anillo heterocíclico o carbocíclico o aromático. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitarse a, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino,

5 morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3,1,0]hexanilo, 3-azabicyclo[4,1,0]heptanilo, y azabicyclo[2,2,2]hexanilo. Las porciones espiro se incluyen además dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de un grupo heterocíclico en donde los átomos anulares se sustituyen con porciones oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo.

10 El término “**heteroarilo**” se refiere a un radical aromático monovalente de 5 ó 6 miembros anulares, e incluye sistemas anulares fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-18 átomos, que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (que incluyen, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (que incluyen, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, y furopiridinilo.

20 Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden ser carbono (enlazado al carbono) o nitrógeno (enlazado al nitrógeno) unidos donde esto sea posible. A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos al carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5, ó 6 de una piridina, posición 3, 4, 5, ó 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5, ó 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5, ó 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4, ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4, ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4, ó 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, posición 2 ó 3 de una aziridina, posición 2, 3, ó 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina.

30 A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos al nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol, o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol, u O-carbolina.

Los heteroátomos presentes en el heteroarilo o heterociclilo incluyen las formas oxidadas tales como NO, SO, y SO₂.

35 El término “**halo**” o “**halógeno**” se refiere a F, Cl, Br o I.

El alquilo, alqueno, alquino, alquilo cíclico, alqueno cíclico, alquino cíclico, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo descritos anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes.

40 Si un sustituyente se describe como “**sustituido**”, un sustituyente no hidrógeno está en el lugar de un sustituyente hidrógeno en un carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno del sustituyente. Así, por ejemplo, un sustituyente alquilo sustituido es un sustituyente alquilo en donde al menos un sustituyente no hidrógeno está en el lugar de un sustituyente hidrógeno en el sustituyente alquilo. Para ilustrar, el monofluoroalquilo es alquilo sustituido con un sustituyente fluoro, y difluoroalquilo es alquilo sustituido con dos sustituyentes fluoro. Debe reconocerse que si hay más de una sustitución en un sustituyente, cada sustituyente no hidrógeno puede ser idéntico o diferente (a menos que se declare de cualquier otra forma).

50 Si un sustituyente se describe como que está “**opcionalmente sustituido**”, el sustituyente puede estar (1) no sustituido, o (2) sustituido. Si un carbono de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el carbono (en la medida en que hay alguno) puede separadamente y/o juntos ser reemplazados con un sustituyente opcional independientemente seleccionado. Si un nitrógeno de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el nitrógeno (en la medida en que hay alguno) pueden cada uno ser reemplazados con un sustituyente opcional independientemente seleccionado. Un sustituyente ilustrativo puede representarse como -NR'R”, en donde R' y R” junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden formar un anillo heterocíclico. El anillo heterocíclico formado a partir de R' y R” junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos puede ser parcialmente o totalmente saturado. En una realización, el anillo heterocíclico consiste en 3 a 7 átomos. En otra realización, el anillo heterocíclico se selecciona del grupo que consiste en pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, piridilo y tiazolilo.

60 Esta descripción usa los términos “**sustituyente**”, “**radical**”, y “**grupo**” indistintamente.

65 Si un grupo de sustituyentes se describe colectivamente como opcionalmente sustituidos por uno o más de una lista de sustituyentes, el grupo puede incluir: (1) sustituyentes insustituibles, (2) sustituyentes sustituibles que no están sustituidos por los sustituyentes opcionales, y/o (3) sustituyentes sustituibles que están sustituidos por uno o más de los sustituyentes opcionales.

Si un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con hasta un número particular de sustituyentes no hidrógeno, ese sustituyente puede estar (1) no sustituido; o (2) sustituido por hasta ese número particular de sustituyentes no hidrógeno o por hasta el número máximo de posiciones sustituibles en el sustituyente, el que sea menor. Así, por ejemplo, si un sustituyente se describe como un heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes no hidrógeno, entonces cualquier heteroarilo con menos de 3 posiciones sustituibles puede ser opcionalmente sustituido con hasta sólo tantos sustituyentes no hidrógenos como posiciones sustituibles tiene el heteroarilo. Tales sustituyentes, en ejemplos no limitantes, pueden ser seleccionados de un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂],

-OR¹⁰⁰, NR¹⁰¹R¹⁰², -NO₂, -NR¹⁰¹COR¹⁰², -SR¹⁰⁰, un sulfóxido representado por -SOR¹⁰¹, una sulfona representada por -SO₂R¹⁰¹, un sulfonato -SO₃M, un sulfato -OSO₃M, una sulfonamida representada por -SO₂NR¹⁰¹R¹⁰², ciano, un azido, -COR¹⁰¹, -OCOR¹⁰¹, -OCONR¹⁰¹R¹⁰² y una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_nR¹⁰¹ en donde M es H o un catión (tal como Na⁺ o K⁺); R¹⁰¹, R¹⁰² y R¹⁰³ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol

(-OCH₂CH₂)_n-R¹⁰⁴, en donde n es un número entero de 1 a 24, un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono y un heteroarilo que tiene 5 a 10 átomos de carbono; y R¹⁰⁴ es H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, en donde el alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo y heterociclilo en los grupos representados por R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ y R¹⁰⁴ están opcionalmente sustituidos con uno o más (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, -OH,

-CN, -NO₂ y alquilo lineal o ramificado insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, los sustituyentes para el alquilo opcionalmente sustituido, alqueno, alquino, alquilo cíclico, alqueno cíclico, alquino cíclico, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo descritos anteriormente incluyen halógeno, -CN, -NR¹⁰²R¹⁰³, -CF₃, -OR¹⁰¹, arilo, heteroarilo, heterociclilo, -SR¹⁰¹, -SOR¹⁰¹, -SO₂R¹⁰¹ y -SO₃M.

El término “**compuesto**” o “**compuesto citotóxico**”, “**dímero citotóxico**” y “**compuesto dímero citotóxico**” se usan indistintamente. Éstos pretenden incluir los compuestos para los cuales una estructura o fórmula o cualquier derivado de éste se ha descrito en la presente invención. El término incluye además, estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, solvatos, metabolitos, sales (*por ejemplo*, sales farmacéuticamente aceptables) y profármacos, y sales del profármaco de un compuesto de todas las fórmulas descritas en la presente invención. El término incluye además cualquier solvato, hidrato, y polimorfos de cualquiera de los anteriores. La mención específica de “estereoisómeros”, “isómeros geométricos”, “tautómeros”, “solvatos”, “metabolitos”, “sal”, “profármaco”, “sal de profármaco”, “conjugados”, “sal de conjugados”, “solvato”, “hidrato”, o “polimorfo” en ciertos aspectos de la invención descritos en esta solicitud no debe interpretarse como una omisión intencional de esas formas en otros aspectos de la invención donde el término “compuesto” se usa sin mención de esas otras formas.

El término “**conjugado**” como se usa en la presente se refiere a un compuesto descrito en la presente o un derivado de éste que está unido a un agente de unión celular.

El término “**enlazable a un agente de unión celular**” como se usa en la presente se refiere a los compuestos descritos en la presente o derivados de éstos que comprenden al menos un grupo de enlace o un precursor de éste adecuado para unir estos compuestos o derivados de éstos a un agente de unión celular.

El término “**precursor**” de un grupo dado se refiere a cualquier grupo que puede dar lugar a ese grupo por cualquier desprotección, una modificación química, o una reacción de acoplamiento .

El término “**enlazado a un agente de unión celular**” se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos uno de los compuestos descritos en la presente (*por ejemplo*, los compuestos de la Fórmula (I)-(IV) y (VIII)-(XI) y los compuestos de unión al fármaco descritos en la presente), o derivado de éste unido a un agente de unión celular a través de un grupo de enlace adecuado o un precursor de éste.

El término “**quiral**” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición de imágenes especulares, mientras el término “**aquiral**” se refiere a moléculas que son superponibles en imágenes especulares.

El término “**estereoisómero**” se refiere a compuestos que tienen constitución y conectividad química idéntica, pero orientaciones diferentes de sus átomos en el espacio que no pueden interconvertirse por la rotación alrededor de los enlaces simples.

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

“**Enantiómeros**” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en la presente descripción generalmente siguen 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 lo tanto existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, que incluyen pero sin limitarse a, diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de éstos tales como las mezclas racémicas, forman parte de la presente invención. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada plana. Al describir un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d e l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano de la luz polarizada por el compuesto, donde (-) o l significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto que ellos son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede referirse además como un enantiómero, y una mezcla de esos isómeros se llama frecuentemente una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se refiere como una mezcla racémica o un racemato, lo que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

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

El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma de derivado de un compuesto de la invención que es capaz de ser enzimáticamente o hidrolíticamente activado o convertido en la forma parental más activa. Ver, *por ejemplo*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, págs. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero sin limitarse a, profármacos que contienen éster, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados de D-aminoácido, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para usar en esta invención incluyen, pero sin limitarse a, compuestos de la invención y agentes quimioterapéuticos como se describió anteriormente.

El término "profármaco" significa además un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar, o reaccionar de cualquier otra forma bajo condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto de esta invención. Los profármacos solamente se pueden hacer activos con tal reacción bajo condiciones biológicas, o éstos pueden tener actividad en sus formas no reaccionadas. Los ejemplos de profármacos contemplados en esta invención incluyen, pero sin limitarse a, análogos o derivados de los compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden porciones biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y análogos de fosfato biohidrolizables. Otros ejemplos de profármacos incluyen derivados de compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden porciones -NO, -NO₂, -ONO, o -ONO₂. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando métodos bien conocidos, tal como los descritos por Burger's Medicinal Chemistry y Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5ª ed); ver además Goodman y Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8ª ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

Una forma preferida del profármaco de la invención incluye compuestos (con o sin grupos enlazadores) y conjugados de la invención que comprenden un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos / conjugados y un reactivo de imina reactiva. Otra forma de profármaco preferida de la invención incluye compuestos tales como aquellos de la Fórmula (I) - (IV), en donde cuando la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple, X es H o un grupo protector amina, y el compuesto se convierte en un profármaco. Un profármaco de la invención puede contener una o las dos formas de profármacos descritas en la presente descripción, (*por ejemplo*, conteniendo un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos / conjugados y un reactivo de imina reactiva, y/o conteniendo un grupo saliente Y cuando X es -H).

El término "reactivo de imina reactiva" se refiere a un reactivo que es capaz de reaccionar con un grupo imina. Los ejemplos de reactivo de imina reactiva incluyen, pero sin limitarse a, sulfitos (H₂SO₃, H₂SO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono, di, tri, y tetra- tiofosfatos (PO₃SH₃, PO₂S₂H₃, POS₃H₃, PS₄H₃ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato ésteres ((RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱSH, RⁱSOH, RⁱSO₂H, RⁱSO₃H), varias aminas (hidroxil amina (*por*

ejemplo, NH_2OH), hidrazina (*por ejemplo*, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^i\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ tiosulfato ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ o una sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formada con un catión), ditionita ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ o una sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formada con un catión), fósforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ o una sal formada con un catión), hidrazida ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), formaldehído sulfoxilado ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ o una sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formada con un catión, tal como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), nucleótido glicado (tal como GDP-manosa), fludarabina o una mezcla de éstos, en donde R^i y R^j son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y están sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de $-\text{N}(\text{R}^l)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, y $-\text{PO}_3\text{H}$; R^l y R^m puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^i es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; y R^k es un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo (preferentemente, R^k es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; con mayor preferencia, R^k es metilo, etilo o propilo). Preferentemente, el catión es un catión monovalente, tal como Na^+ o K^+ . Preferentemente, el reactivo de imina reactiva se selecciona de sulfitos, hidroxil amina, urea e hidrazina. Con mayor preferencia, el reactivo de imina reactiva es NaHSO_3 o KHSO_3 .

Como se usa en la presente y a menos que se indique de cualquier otra forma, los términos “**amida biohidrolizable**”, “**éster biohidrolizable**”, “**carbamato biohidrolizable**”, “**carbonato biohidrolizable**”, “**ureido biohidrolizable**” y “**análogo de fosfato biohidrolizable**” significan una amida, éster, carbamato, carbonato, ureido, o análogo de fosfato, respectivamente, que: 1) no destruye la actividad biológica del compuesto y confiere propiedades ventajosas a los compuestos *in vivo*, tales como captación, duración de la acción, o inicio de la acción; o 2) es en sí mismo biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* en un compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, pero sin limitarse a, amidas de alquilo inferior, amidas de α -aminoácido, alcoxiacil amidas, y alquilaminoalquilcarbonil amidas. Los ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, pero sin limitarse a, ésteres de alquilo inferior, alcoxiaciloxi ésteres, ésteres de alquil acilamino alquilo, y ésteres de colina. Los ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, pero sin limitarse a, alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas, y poliéter aminas. Particularmente, los profármacos y sales de profármaco favorecidos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando tales compuestos se administran a un mamífero.

La frase “**sal farmacéuticamente aceptable**” como se usa en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Las sales ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfórico, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato “mesilato”, etanosulfonato, benzenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (*es decir*, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxí-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (*por ejemplo*, sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (*por ejemplo*, magnesio), y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contra ion. El contra ion puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica, que estabiliza la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contra-iones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contra-iones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa hidroxí, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluensulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse por cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metales alcalinos o hidróxido de metal alcalino térreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias o terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas del sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

Como se usa en la presente, el término “**solvato**” significa un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente tal como, agua, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina diclorometano, 2-propanol, o similares, unidos por fuerzas intermoleculares no covalentes. Los solvatos o hidratos de los compuestos se preparan fácilmente por adición de al menos un equivalente molar de un solvente hidroxílico tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol o agua al compuesto para dar lugar a la solvatación o hidratación de la porción imina.

Los términos “**crecimiento anormal de la célula**” y “**trastorno proliferativo**” se usan indistintamente en esta solicitud. El “**crecimiento anormal de la célula**,” como se usa en la presente, a menos que se indique de cualquier otra forma, se refiere al crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (*por ejemplo*, pérdida de la inhibición por contacto). Esto incluye, por ejemplo, el crecimiento anormal de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan por la expresión de una tirosina quinasa mutada o sobreexpresión de un receptor de tirosina quinasa; (2) células benignas o malignas de otras enfermedades proliferativas en las cuales ocurre la activación aberrante de la tirosina quinasa; (3) cualquiera de los tumores que proliferan mediante el receptor de tirosina quinasa; (4) cualquiera de los tumores que proliferan por la activación aberrante de la serina/treonina quinasa; y (5) células benignas o malignas de otras enfermedades proliferativas en las que ocurre la activación aberrante de la serina/treonina quinasa.

Los términos “**cáncer**” y “**canceroso**” se refieren a o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Un “**tumor**” comprende una o más células cancerosas, y/o células benignas o pre-cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (*por ejemplo*, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye el cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (“NSCLC”), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye el cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer del recto, cáncer colorectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma de ano, carcinoma de pene, leucemia aguda, cáncer de cabeza/cerebro y cuello, cánceres de órganos linfáticos y malignidad hematológica que incluyen la leucemia (leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena Aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica Aguda (AMOL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular de células grandes, leucemia de células T adultas), linfoma (linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfomas de Hodgkin (esclerosis nodular, celularidad mixta, rica en linfocitos, linfocitos agotados o no agotados, y linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos), linfomas No-Hodgkin (todos los subtipos), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico (tales como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, neoplasma de células plasmáticas (mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulina monoclonal, enfermedades de cadena pesada), linfoma extranodal marginal de células B (linfoma de MALT), linfoma nodal zona marginal de células B (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastinal (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma extranodal de células T/NK (tipo nasal), linfoma de células T tipo enteropático, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoides / síndrome de Sézary, trastornos primarios cutáneos linfoproliferativos de células T positivas a CD30, linfoma primario cutáneo de células grandes anaplásicas, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma periférico de células T (inespecífico), linfoma de células grandes anaplásicas), mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler).

Un “**agente terapéutico**” incluye tanto un agente biológico tal como un anticuerpo, un péptido, una proteína, una enzima o un agente quimioterapéutico.

Un “**agente quimioterapéutico**” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), Sunitinib (SU11248, Pfizer), Letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de Imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafarnib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs), y Gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogéninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético de tocotecán); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos 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 sarcodictina; espongiostatina; mostaza de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (*por ejemplo*, caliceamicina, especialmente caliceamicina gamma y caliceamicina omegal (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos asociados a cromoproteína del antibiótico

enediina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN® (doxorubicina), morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de la purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, thiamnirprina, tioguanina; análogos de la pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano testolactona; anti-adrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tales como ácido froilínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de elliptinico; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK® complejo de polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxana; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente T-2 axina, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, *por ejemplo*, TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (libre de Cremóforo), formulaciones de paclitaxel con nanopartículas de albúmina modificadas por ingeniería genética (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranmbucilo; GEMZAR® (gemcitabina); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatina; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

Además incluido en la definición de "agente quimioterapéutico" están: (i) agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromataza que inhiben la enzima aromastasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, 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, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo del nucleósido citosina 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína quinasa (v) inhibidores lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación aberrante de células, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (*por ejemplo*, ANGIOZYME®) y inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de tearpias de genes, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; un inhibidor de topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rMRH; (ix) agentes anti-angiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y (x) sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores. Otros agentes anti-angiogénicos incluyen los inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de la matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de la matriz 9), inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II), e inhibidores del receptor tirosina quinasa VEGF. Los ejemplos de tales inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz útiles que pueden usarse en conjunto con los presentes compuestos/composiciones se describen en WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606,046, EP 931,788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, Pat. U.S., No. 5,863,949, Pat. U.S., No. 5,861,510, y EP 780,386, Los ejemplos de inhibidores del receptor tirosina quinasa VEGF incluyen 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 de WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)-quinazolina (AZD2171; Ejemplo 240 de WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) y SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), y compuestos tales como los descritos en las publicaciones PCT núms. WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856, y WO 98/13354).

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en conjunto con los presentes compuestos incluyen los inhibidores de PI3K (fosfoinosítido-3 quinasa), tales como aquellos informados en Yaguchi *et al* (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98(8):545-556; Pat. U.S., No. 7,173,029; Pat. U.S., No. 7,037,915; Pat. U.S., No. 6,608,056; Pat. U.S., No. 6,608,053; Pat. U.S., No. 6,838,457; Pat. U.S., No. 6,770,641; Pat. U.S., No. 6,653,320; Pat. U.S., No. 6,403,588; WO 2006/046031; WO 2006/046035; WO 2006/046040; WO 2007/042806; WO 2007/042810; WO 2004/017950; US 2004/092561; WO 2004/007491; WO 2004/006916; WO 2003/037886; US 2003/149074; WO 2003/035618; WO 2003/034997; US 2003/158212; EP 1417976; US 2004/053946; JP 2001247477; JP 08175990; JP 08176070; Pat. U.S., No. 6,703,414; y WO 97/15658, Los ejemplos específicos de

dichos inhibidores de PI3K incluyen SF-1126 (inhibidor PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor PI3K, Exelixis, Inc.).

Los agentes quimioterapéuticos pueden incluir además cualquiera de los fármacos genéricos o biosimilares de los fármacos de marca referenciados en la presente, o mejoras de éstos, incluyendo formulaciones mejoradas, profármacos, medios de administración (liberación sostenida, revestimiento bioadesivo, entrega dirigida *etc.*), y formas de dosificación.

Un “**metabolito**” es un producto producido a través del metabolismo en el cuerpo de un compuesto específico, un derivado de éste, o un conjugado de éste, o sal de éste. Los metabolitos de un compuesto, un derivado de éste, o un conjugado de éste, puede identificarse usando técnicas de rutina conocidas en la técnica y sus actividades determinadas usando pruebas tales como las descritas en la presente descripción. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, a partir de la oxidación, hidroxilación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática, y similares, del compuesto administrado. En consecuencia, la invención incluye metabolitos de los compuestos, un derivado de éste, o un conjugado de éste, de la invención, que incluyen compuestos, un derivado de éste, o un conjugado de éste, producidos por un proceso que comprende contactar un compuesto, un derivado de éste, o un conjugado de éste, de esta invención con un mamífero por un periodo de tiempo suficiente para obtener un producto metabólico de éste.

La frase “**farmacéuticamente aceptable**” indica que la sustancia o composición debe ser compatible químicamente y/o toxicológicamente, con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que se trata con la misma.

El término “**grupo protector**” o “**resto protector**” se refiere a un sustituyente que se emplea comúnmente para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras reaccionan otros grupos funcionales en el compuesto, un derivado de éste, o un conjugado de éste. Por ejemplo, un “**grupo protector amino**” o un “**resto protector de amino**” es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Tales grupos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, P. Wuts y T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, Capítulo 7, J. Wiley & Sons, NJ) y ejemplificados por carbamatos tal como metil y etil carbamato, FMOC, etil carbamatos sustituidos, carbamatos escindidos por eliminación 1,6-β (además llamado “**auto-inmolativo**”), derivados de ureas, amidas, péptidos, alquilo y arilo. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). Para una descripción general de los grupos protectores y su uso, ver P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 2007.

El término “**grupo saliente**” se refiere a un grupo de resto cargado o no cargado que sale durante una sustitución o desplazamiento. Tales grupos salientes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, halógenos, ésteres, alcoxi, hidroxilo, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, carbamato, disulfuros, tioésteres, tioéteres y compuestos de diazonio.

El término “**agente de entrecruzamiento bifuncional**”, “**enlazador bifuncional**” o “**agentes de entrecruzamiento**” se refiere a agentes modificadores que poseen dos grupos reactivos; uno de cuales es capaz de reaccionar con un agente de unión celular mientras que otro reacciona con el compuesto citotóxico para enlazar las dos porciones juntas. Tales entrecruzadores bifuncionales son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Isalm y Dent en *Bioconjugation* capítulo 5, págs. 218-363, Groves Dictionaries Inc. Nueva York, 1999). Por ejemplo, los agentes de entrecruzamiento bifuncionales que permiten el enlace a través de un enlace tioéter incluyen *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para introducir grupos maleimido, o con *N*-succinimidil-4-(yodoacetilo)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. Otros agentes de entrecruzamiento bifuncionales que introducen grupos maleimido o grupos haloacetilo en un agente de unión celular son bien conocidos en la técnica (ver las solicitudes de Patente US 2008/0050310, 20050169933, disponibles de Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, Estados Unidos) e incluyen, pero sin limitarse a, bis-maleimidopolietilenglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(□-maleimidopropiloxi)succinimida éster (BMPS), N-succinimidil éster del ácido □-maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster del ácido □-maleimidocaproico (EMCS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, N-succinimidil-4-(*N*-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de SMCC de “cadena larga” (LC-SMCC), m-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida éster (MBS), hidrazida del ácido 4-(4-*N*-maleimidofenil)-butírico o sal de HCl (MPBH), N-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil éster del ácido □-maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil 4-(p-maleimidofenilo)-butirato (SMPB), succinimidil-6-□-maleimidopropionato)hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonilo)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxitano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfosuccinimidil 4-(*N*-maleimido-metilo)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-yodo-acetilo)aminobenzoato (sulfo-SIAB), m-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo-MBS), N-(□-maleimidobutirilo) sulfosuccinimida éster (sulfo-GMBS), N-(□-maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-EMCS), N-(□-maleimidoundecanoiloxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-KMUS), y sulfosuccinimidil 4-(p-maleimidofenilo)butirato (sulfo-SMPB).

Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales son agentes de entrecruzamiento bifuncionales que tienen dos

grupo reactivos diferentes. Los agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales que contienen un grupo *N*-hidroxisuccinimida (grupo NHS) reactivo con amino y un grupo hidrazina reactivo con carbonilo pueden usarse además para enlazar los compuestos citotóxicos descritos en la presente con un agente de unión celular (por ejemplo, anticuerpo). Los ejemplos de tales agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales comercialmente disponibles incluyen succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), hidrocloreto de succinimidil 4-hidrazidotereftalato (SHTH) e hidrocloreto de succinimidil hidrazino nicotinato (SHNH). Los conjugados que portan un enlace ácido lábil pueden prepararse además usando un derivado de benzodiazepina que porta hidrazina de la presente invención. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento bifuncionales que pueden usarse incluyen succinimidil-*p*-formil benzoato (SFB) y succinimidil-*p*-formilfenoxiacetato (SFPA).

Los agentes de entrecruzamiento bifuncionales que permiten el enlace del agente de unión celular con los compuestos citotóxicos a través de enlaces disulfuro son conocidos en la técnica e incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. Otros agentes de entrecruzamiento bifuncionales que pueden usarse para introducir grupos disulfuro son conocidos en la técnica y se describen en las Patentes U.S. 6,913,748, 6,716,821 y las Publicaciones de Patentes US 20090274713 y 20100129314, Alternativamente, pueden usarse también agentes de entrecruzamiento tales como 2-iminotiolana, homocisteína tiolactona o anhídrido *S*-acetilsuccínico que introduce grupos tiol.

Un “enlazador”, “resto enlazador”, o “grupo de enlace” como se define en la presente se refiere a un resto que conecta dos grupos, tal como un agente de unión celular y un compuesto citotóxico, juntos. Típicamente, el enlazador es sustancialmente inerte bajo las condiciones en las que se enlazan los dos grupos que conecta. Un agente de entrecruzamiento bifuncional puede comprender dos grupos reactivos, uno en cada extremo de un resto enlazador, de modo que un grupo reactivo puede reaccionar primero con el compuesto citotóxico para proporcionar un compuesto que porta el resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que puede reaccionar después con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del agente de entrecruzamiento bifuncional puede reaccionar primero con el agente de unión celular para proporcionar un agente de unión celular que porta un resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que puede reaccionar después con un compuesto citotóxico. El resto enlazador puede contener un enlace químico que permite la liberación de la porción citotóxica en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de ésterasa (ver por ejemplo, las Patentes US 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 y 7,414,073). Los preferidos son los enlaces disulfuro, tioéter y enlaces lábiles de peptidasa. Otros enlazadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, tales como los descritos en detalle en la Publicación US número 20050169933, o enlazadores cargados o enlazadores hidrófilos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976,

En una realización, el grupo de enlace con un grupo reactivo unido en un extremo, tal como un éster reactivo, se selecciona de los siguientes:

- $O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $O(CR_{20}R_{21})_m(alquinilo)_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $O(CR_{20}R_{21})_m(piperazino)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $O(CR_{20}R_{21})_m(pirrololo)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $O(CR_{20}R_{21})_m A''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m(alquinilo)_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m(piperazino)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m(pirrololo)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $S(CR_{20}R_{21})_m A''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(alquinilo)_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(piperazino)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m(pirrololo)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $NR_{33}(C=O)_p(CR_{20}R_{21})_m A''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(alquinilo)_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(piperazino)_t(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m A''_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(CR_{26}=CR_{27})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,
- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_n(alquinilo)_n(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_p^p Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_t X''$,

- $(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_nA^m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_pY''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,
en donde:

- 5 m, n, p, q, m', n', t' son un número entero de 1 a 10, o son opcionalmente 0;
t, m'', n'', y p'' son 0 ó 1;
X'' se selecciona de OR₃₆, SR₃₇, NR₃₈R₃₉, en donde R₃₆, R₃₇, R₃₈, R₃₉ son H, o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 20 átomos de carbono y, o, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, R₃₇, opcionalmente, es un grupo protector tiol cuando t = 1, COX'' forma un éster reactivo seleccionado de N-hidroxisuccinimida ésteres, N-hidroxifalimida ésteres, N-hidroxi sulfo-succinimida ésteres, para-nitrofenil ésteres, dinitrofenil ésteres, pentafluorofenil ésteres y sus derivados, en donde dichos derivados facilitan formación del enlace amida;
10 Y'' está ausente o se selecciona de O, S, S-S o NR₃₂, en donde R₃₂ tiene la misma definición dada anteriormente para R; o
cuando Y'' no es S-S y t = 0, X'' se selecciona de un grupo maleimido, un grupo haloacetilo o SR₃₇, en donde R₃₇ tiene la misma definición dada anteriormente;
15 A'' es un aminoácido seleccionado de glicina, alanina, leucina, valina, lisina, citrulina y glutamato o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos;
R₂₀, R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆, y R₂₇ son iguales o diferentes, y son -H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono;
20 R₂₉ y R₃₀ son iguales o diferentes, y son -H o alquilo de 1 a 5 átomos de carbono;
R₃₃ es -H o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $R-(OCH_2CH_2)_n-$, o R₃₃ es -COR₃₄, -CSR₃₄, -SOR₃₄, o -SO₂R₃₄, en donde R₃₄ es H o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 20 átomos de carbono o, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$; y
25 uno de R₄₀ y R₄₁ es opcionalmente un grupo funcional negativamente o positivamente cargado y el otro es H o alquilo, alquenilo, alquinilo que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

30 Cualquiera de los grupos enlazadores anteriores se puede presentar en cualquiera de los compuestos, compuestos de fármaco-enlazador, o conjugados de la invención, incluyendo el reemplazar de los grupos de enlace de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente.

35 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural o aminoácidos que no son de origen natural representados por $NH_2-C(R^{aa}R^{aa'})-C(=O)OH$, en donde R^{aa} y R^{aa'} son cada uno independientemente H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterociclilo. El término "aminoácido" se refiere además al residuo correspondiente cuando un átomo de hidrógeno se elimina del extremo amino y/o carboxi del aminoácido, tal como $-NH-C(R^{aa}R^{aa'})-C(=O)O-$.

40 El término "catión" se refiere a un ion con carga positiva. El catión puede ser monovalente (por ejemplo, Na⁺, K⁺, etc.), bivalente (por ejemplo, Ca²⁺, Mg²⁺, etc.) o multivalente (por ejemplo, Al³⁺ etc.). Preferentemente, el catión es monovalente.

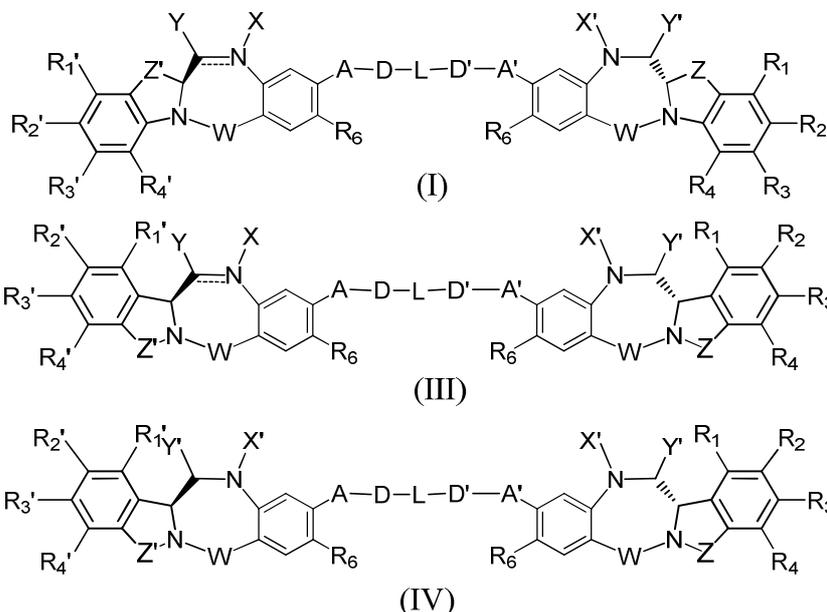
45 El término "cantidad terapéutica eficaz" significa la cantidad del compuesto activo o conjugado que provoca la respuesta biológica deseada en el sujeto. Tal respuesta incluye alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata, prevención, inhibición o un retraso en la reaparición del síntoma de la enfermedad o de la propia enfermedad, un aumento en la longevidad del sujeto comparado con la ausencia del tratamiento, o prevención, inhibición o retraso en la progresión del síntoma de la enfermedad o la propia enfermedad. La determinación de la cantidad eficaz está bien aceptada dentro de la capacidad de las personas expertas en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada que se proporciona en la presente descripción. La toxicidad y eficacia terapéutica del compuesto I puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares y en animales de experimentación. La cantidad eficaz del compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se administra a un sujeto dependerá de la estadio, categoría y estado del mieloma múltiple y características del sujeto, tal como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia al fármaco. La cantidad eficaz del compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se administra además dependerá de la vía de administración y la forma de dosificación. La cantidad de dosificación y el intervalo puede ajustarse individualmente para proporcionar niveles del compuesto activo que son suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados.

COMPUESTOS CITOTÓXICOS

60 La presente invención se dirige a los compuestos citotóxicos descritos en la presente descripción (por ejemplo, compuestos de la Fórmulas (I), (III), y (IV)). Los compuestos citotóxicos de la presente invención no incluyen ninguno de los compuestos descritos en US 2010/0203007, tales como aquellos específicamente no reivindicados en la condición más abajo.

65 En una primera realización específica, la invención proporciona un compuesto citotóxico que comprende un grupo de enlace con un grupo reactivo unido a éste capaz de unir covalentemente el compuesto citotóxico a un agente de

unión celular (CBA), en donde dicho compuesto citotóxico se representa por cualquiera de las siguientes fórmulas (I), (III) o (IV):



5

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace, X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o una resto protector de amina; preferentemente, la doble línea \equiv entre N y C representa un doble enlace;

Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido, en donde M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺. Preferentemente, M es -H o Na⁺. Preferentemente, Y se selecciona de -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH. Con mayor preferencia, Y es -SO₃M o -OH; o,

Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiofosfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, PO₃S₂H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fósforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de éstos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(Rⁱ)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; Rⁱ puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo; preferentemente, Y es un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito un metabisulfito, o sales de éstos (tal como sal sódica);

R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

R' y R'' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

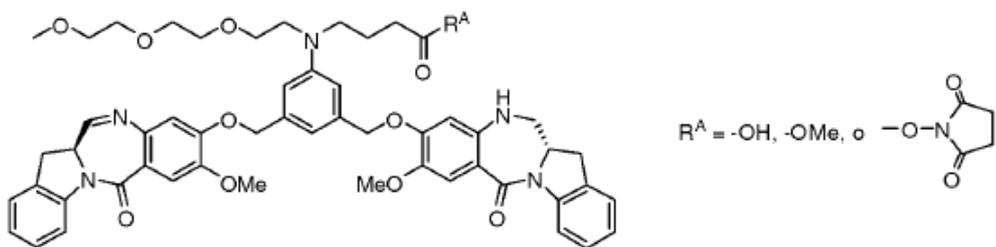
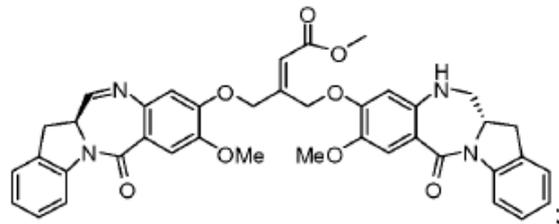
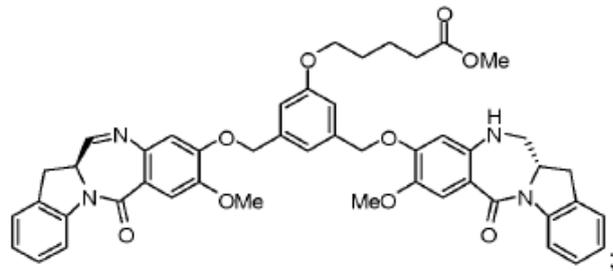
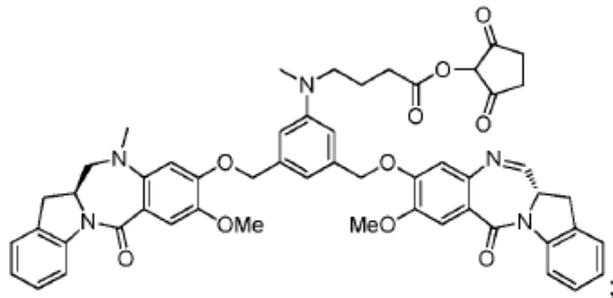
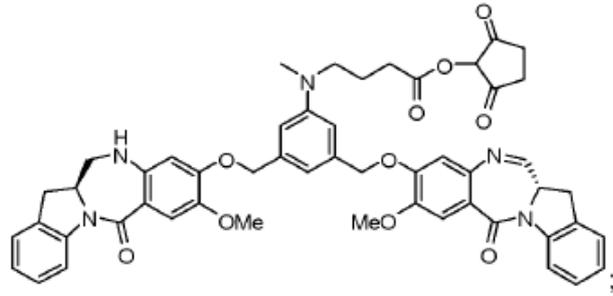
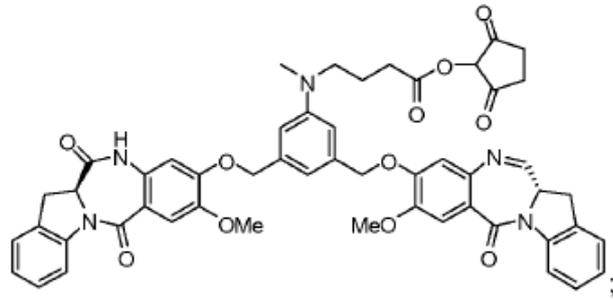
R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;

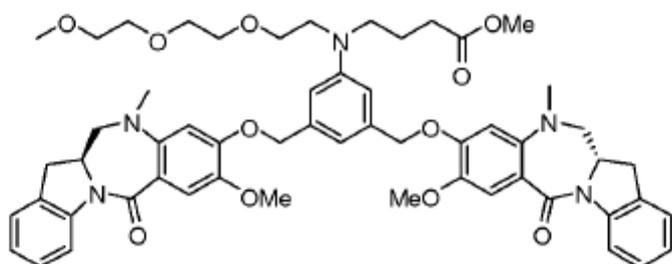
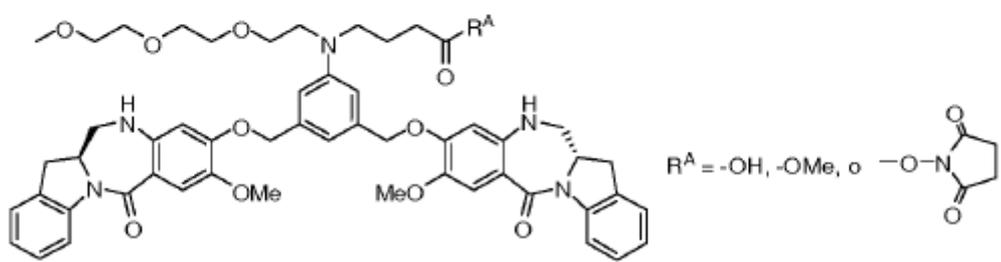
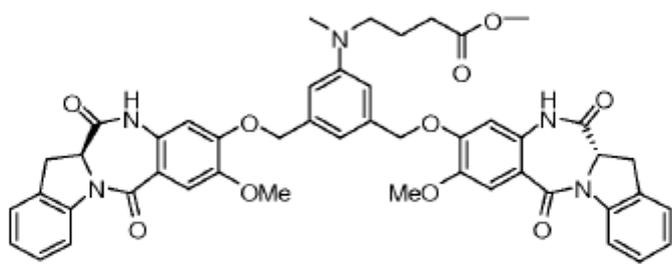
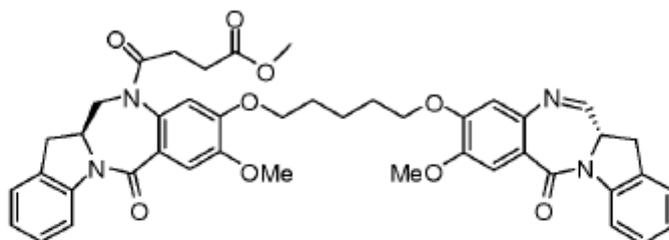
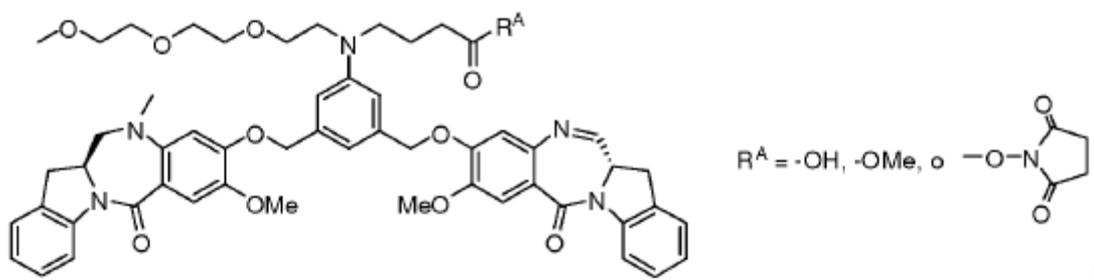
n es un número entero de 1 a 24;

45

- W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO, y SO₂;
- X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un grupo protector amina, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene (*por ejemplo*, fenil) 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P. Preferentemente, X' es -H, -OH, -Me o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. Con mayor preferencia, X' es -H;
- Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos. Preferentemente, Y' se selecciona de -H o oxo. Con mayor preferencia, Y' es -H;
- R₁, R₂, R₃, R₄, R₁' R₂' R₃' y R₄' se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -CONR'R'' y el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. Preferentemente, uno de R₂, R₃, R₂' y R₃' es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste y el resto son -H;
- R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, -OR^c o -SR^c, en donde R^c es -H, un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, R₆ es -OMe o -SMe. Aún con mayor preferencia, R₆ es -OMe;
- Z y Z' se seleccionan independientemente de -(CH₂)_n-, -(CH₂)_n-CR₇R₈-(CH₂)_{na}-, -(CH₂)_n-NR₉-(CH₂)_{na}-, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_{na}- y -(CH₂)_n-S-(CH₂)_{na}-;
- n' y na' son iguales o diferentes, y se seleccionan de 0, 1, 2 y 3;
- R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se selecciona cada uno independientemente de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;
- R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-;
- A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅)- y -CRR'N(R₅)-. Preferentemente, A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -O- y -S-. Con mayor preferencia, A y A' son -O-;
- R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- D y D' son iguales o diferentes, e independientemente están ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, en donde el alquilo, alqueno y alquino están opcionalmente sustituidos con uno o más (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en halógeno, -OR, -NR'COR'', -SR y -COR';
- Preferentemente, D y D' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Con mayor preferencia, D y D' son alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono. Aún con mayor preferencia, D y D' son iguales o diferentes, y se seleccionan de un alquilo lineal que tiene 1 a 4 átomos de carbono;
- L está ausente, es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-, un alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono (*por ejemplo*, 1-6 átomos de carbono), un grupo -fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alqueno está opcionalmente sustituido con el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, siempre que el compuesto no es uno de los compuestos descritos inmediatamente a continuación.

Los compuestos citotóxicos de la presente invención no son ninguno de los compuestos siguientes:





En ciertas realizaciones, X no es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

5

En ciertas realizaciones, Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido. Preferentemente, Y es aducto de bisulfito sódico, aducto de hidrosulfito de sodio, o aducto de metabisulfito sódico. En ciertas realizaciones, Y no es -H.

10

En ciertas realizaciones, L está ausente, o se selecciona de un grupo fenilo opcionalmente sustituido y un grupo piridilo opcionalmente sustituido, en donde el grupo fenilo y piridilo porta el grupo de enlace con el grupo reactivo

15

unido a éste, o L es un grupo amina que porta el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste (*es decir*, -N(grupo de enlace)-), o L es un alquilo o alqueniilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y que porta el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste.

5 En una segunda realización específica, para los dímeros citotóxicos (I), (III) y (IV), las variables son como las descritas más abajo:

la doble línea \equiv entre N y C representa un doble enlace;

Y es -H;

10 W es C=O;

R₁, R₂, R_{1'}, R_{2'}, R₄ y R_{4'} son -H;

uno de R₃, o R_{3'} es opcionalmente un grupo de enlace y el otro es -H;

R₆ es -OMe;

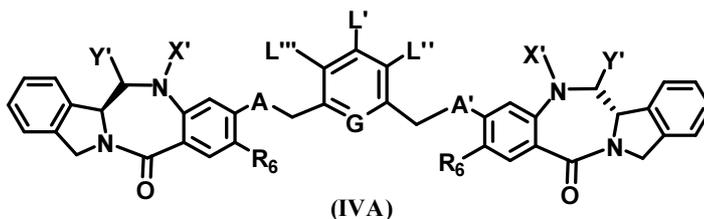
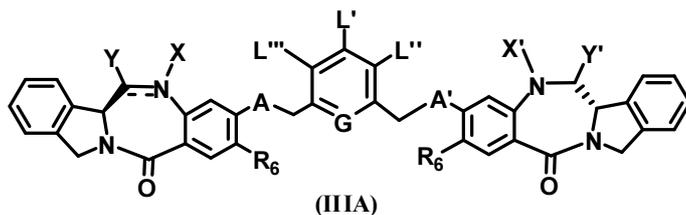
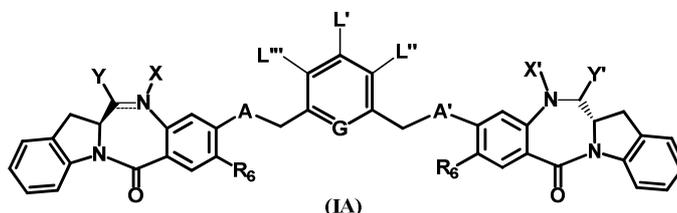
15 Z y Z' son -CH₂-;

X' es -H;

Y' es -H;

A y A' son -O-; y el resto de las variables son como las descritas en la primera realización específica.

20 En una tercera realización específica, los dímeros citotóxicos de la Fórmula (I), (III) y (IV) se representan por las siguientes fórmulas:



en donde:

25 la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X sea seleccionado de -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o un grupo protector amina (preferentemente X es -H);

Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO₃M, -SO₂M, o -OSO₃M, en donde M es -H o un catión tal como Na⁺, K⁺. Preferentemente, Y se selecciona de -OH,

30 -OMe, -OEt, -NHOH o -SO₃M. Aún con mayor preferencia, Y es -OH o -SO₃M, preferentemente M es -H o Na⁺;

R es -H, un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG -(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero de 1 a 24 y R^c es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono;

35 R' y R'' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, -OH, -OR, -NRR^q, -COR, un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo opcionalmente sustituido que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos seleccionados de O, S, N y P, un grupo PEG -

40 -(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero de 1 a 24, preferentemente n es 2, 4 o 8; y R^q es -H, un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG (CH₂CH₂O)_n-R^c;

X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, y un grupo protector amina.

Preferentemente, X' es -H, -OH o -Me. Con mayor preferencia, X' es -H;

Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferentemente, Y' se selecciona de -H o -Me. Con mayor preferencia Y' es -H;

5 R₆ es -OR^c o -SR^c, en donde R^c es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, R₆ es -OMe o -SMe. Aún con mayor preferencia, R₆ es -OMe;

A y A' se seleccionan de -O- y -S-. Preferentemente, A y A' son -O-;

10 L', L'', y L''' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃⁺M⁻, una sulfonamida representada por SO₂NR'R'', ciano, un azido,

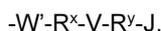
15 -COR', -OCOR', -OCONR'R'' y el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, siempre que sólo uno, de L', L'' y L''' sea el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. Preferentemente, L' es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. Alternativamente, uno de L', L'' o L''' es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, mientras los otros son -H. Con mayor preferencia, L' es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, y L'' y L''' son -H;

20 G se selecciona de -CH- o -N-; y el resto de las variables son como las descritas en la primera realización específica.

En ciertas realizaciones, X no es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste. En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

En ciertas realizaciones, A y A' son ambos -O-, R₆ es -OMe, y G es -CH-.

25 En una cuarta realización específica, para los dímeros citotóxicos de la Fórmula (IA), (IIIA) o (IVA), L' se representa por la fórmula:



en donde:

30 W' y V son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o se selecciona de -CR^eR^e-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, o -C(=O)-, o un aminoácido, o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos;

35 R^x y R^y son iguales o diferentes, y cada uno independientemente está ausente o es un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que porta 6 a 10 átomos de carbono o un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que porta 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N o S;

40 R^e y R^e son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, un alquilo, alqueno, o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino secundario (*por ejemplo*, -NHR¹⁰¹) o amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Preferentemente, R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;

45 n es un entero de 1 a 24; y J comprende el grupo reactivo unido a éste, y se selecciona de una maleimida, un haloacetamido, -SH, -SSR^d, -CH₂SH, -CH(Me)SH, -C(Me)₂SH, -NHR^{c1}, -CH₂NHR^{c1}, -NR^{c1}NH₂, -COOH, y -COE, en donde -COE representa un éster reactivo seleccionado de, pero sin limitarse a, N-hidroxisuccinimida éster, N-hidroxi sulfosuccinimida éster, nitrofenil (*por ejemplo*, 2 ó 4-nitrofenilo) éster, dinitrofenil (*por ejemplo*, 2,4-dinitrofenilo) éster, sulfo-tetrafluorfenil (*por ejemplo*, 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilo) éster, y pentafluorfenil éster, y en donde R^{c1} es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y

55 R^d se selecciona de fenilo, nitrofenilo (*por ejemplo*, 2 ó 4-nitrofenilo), dinitrofenilo (*por ejemplo*, 2 ó 4-nitrofenilo), carboxinitrofenilo (*por ejemplo*, 3-carboxi-4-nitrofenilo), piridilo o nitropiridilo (*por ejemplo*, 4-nitropiridilo).

En ciertas realizaciones, J es -SH, -SSR^d, una maleimida, o un N-hidroxisuccinimida éster.

60 En ciertas realizaciones, R^e es -H o -Me; R^e es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k; n es un número entero de 2 a 8; preferentemente R^k es -H, -Me o -CH₂CH₂-NMe₂, y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la cuarta realización específica.

65 En ciertas realizaciones, V es un aminoácido o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos. En ciertas realizaciones, V es valina-citulina, gly-gly-gly, o ala-leu-ala-leu.

En ciertas realizaciones,

W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;

R^e es H, un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;

5 V está ausente, es -(O-CH₂-CH₂)_n-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

R^y está ausente o es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y

J es -SH, -SSR^d o -COE (preferentemente, N-hidroxisuccinimida éster). El resto de las variables es como se describió en la cuarta realización específica.

10 En ciertas realizaciones,

W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;

R^e es H, Me, o -(CH₂-CH₂-O)_n-Me;

n es un número entero de 2 a 6;

R^x es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 6 átomos de carbono;

15 V y R^y están ausentes; y

J es -COE, preferentemente N-hidroxisuccinimida éster. El resto de las variables es como se describió en la cuarta realización específica.

En una quinta realización específica, L' se representa por la siguiente fórmula:

20



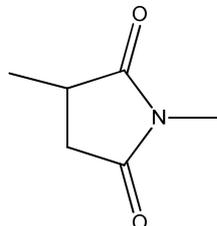
en donde:

25 R₁'', R₂'', y R₃'' son cada uno independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono, preferentemente -Me;

R₄'' es -H, un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono (preferentemente -Me), -SO₃H, o -SO₃M⁺, en donde M⁺ es un catión farmacéuticamente aceptable;

30 a es un número entero de 0-5 (por ejemplo, de 0 a 2, 3, 4, ó 5), y b es un número entero de 0-6 (por ejemplo, de 0 a 3, 4, 5, ó 6); y,

Cy es un anillo heterocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que porta un N heteroátomo, preferentemente Cy es



35 En ciertas realizaciones, W' es -N(R^e)-.

En ciertas realizaciones, tal como en la cuarta y/o la quinta realización específica, R^e es

-(CH₂-CH₂-O)₂₋₆- R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

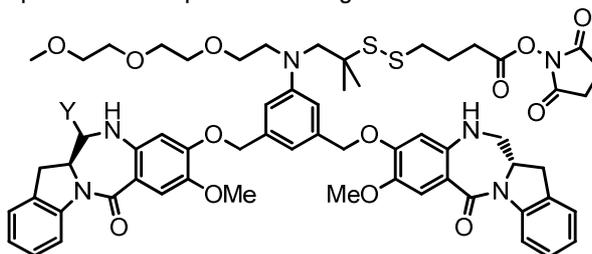
40 En ciertas realizaciones, tal como en la cuarta y la quinta realización específica, V es -S- o -SS-.

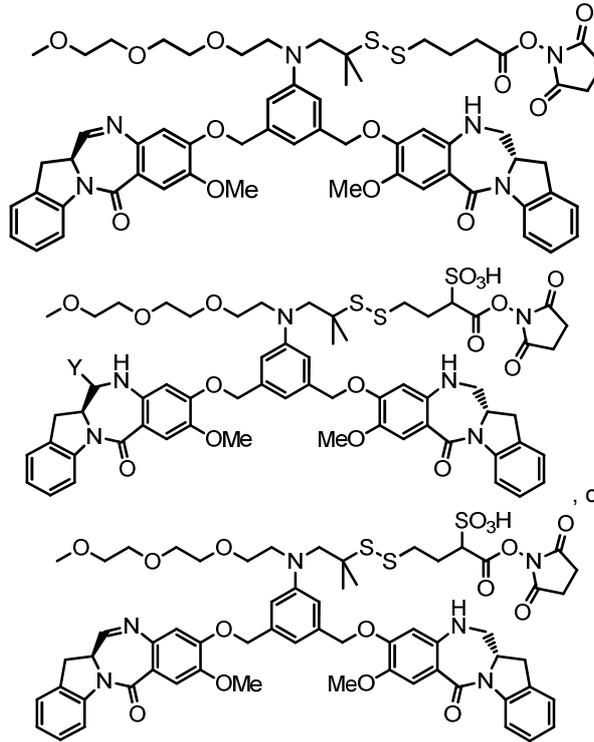
En una sexta realización específicas, tal como en la cuarta y la quinta realización específica, L' se representa por la siguiente fórmula:

45



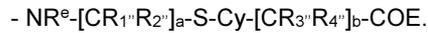
En ciertas realizaciones, el compuesto es cualquiera de los siguientes:





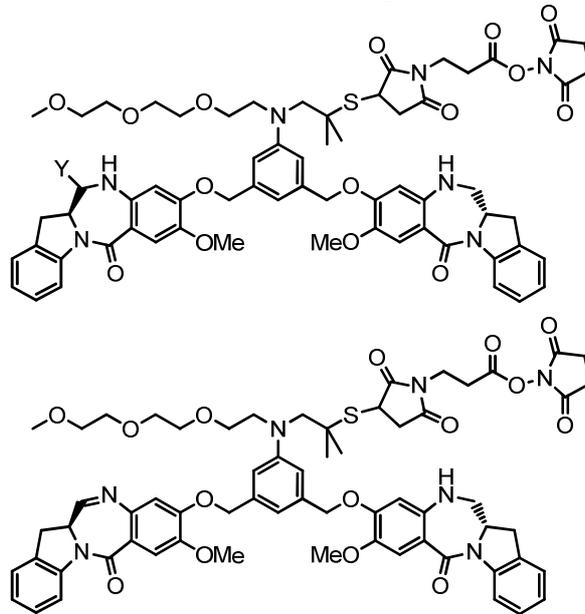
5 en donde Y es -H o -SO₃M, y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, Y es -SO₃M.

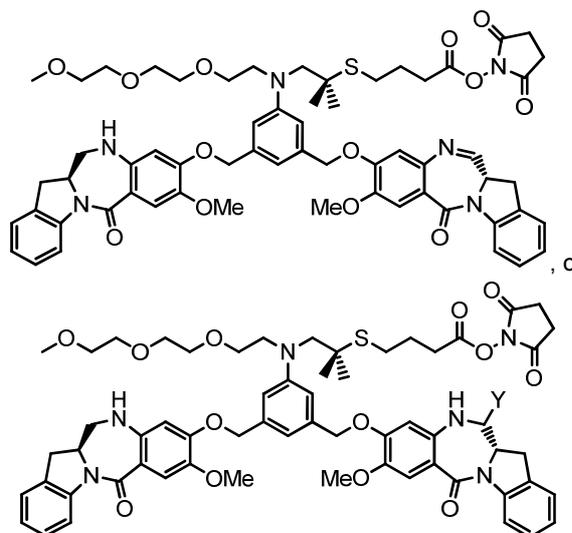
En una séptima realización específica, tal como en la cuarta y la quinta realización específica, L' se representa por la siguiente fórmula:



10

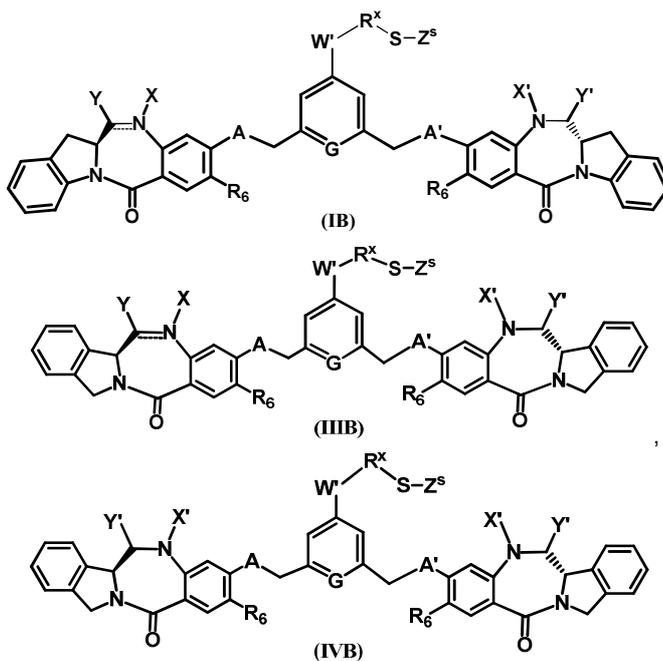
En ciertas realizaciones, el compuesto es uno cualquiera de los siguientes:





en donde Y es -H o -SO₃M, y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, Y es -SO₃M.

5 En una octava realización específica, los dímeros citotóxicos de la fórmula (I), (III) y (IV) se representan por las siguientes fórmulas:



10 en donde:

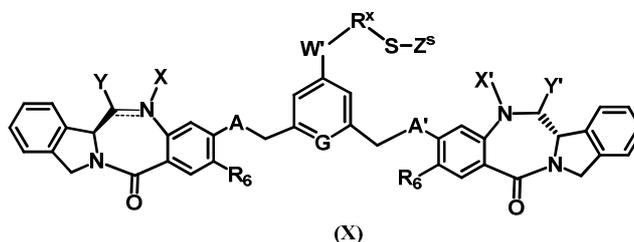
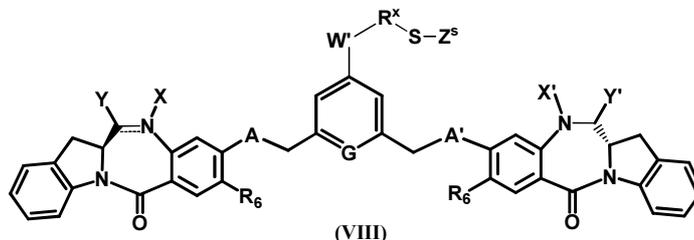
W' está ausente, o se selecciona de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- o -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;
 R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
 15 R^e es -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un amino secundario (*por ejemplo*, -NHR¹⁰¹) o un grupo amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son
 20 cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Preferentemente, R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;
 Z^s es -H, -SR^m;
 R^m es R^d o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono que porta un
 25 éster reactivo, seleccionado de N-hidroxisuccinimida ésteres, N-hidroxitálidimida ésteres, N-hidroxi sulfosuccinimida ésteres, para-nitrofenil ésteres, dinitrofenil ésteres, pentafluorofenil ésteres;
 R^d se selecciona de fenilo, nitrofenilo, dinitrofenilo, carboxinitrofenilo, piridilo o nitropiridilo; y,
 n es un número entero de 1 a 24; y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la tercera

realización específica.

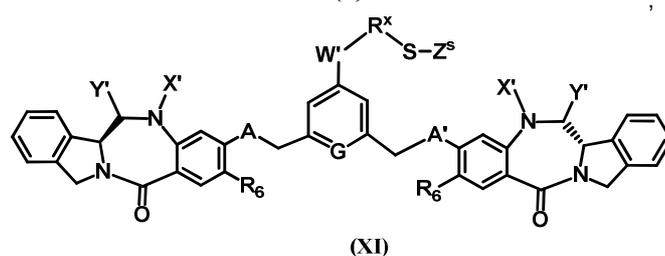
Preferentemente, R^k es -H o -Me, y n es un número entero de 2 a 8, Preferentemente, R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; y el resto de las variables es como se describió anteriormente en la

5

En una novena realización específica, los dímeros citotóxicos de la fórmula (I), (III) y (IV) se representan por las siguientes fórmulas:



10



en donde:

la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace, X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X se seleccione de -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o un grupo protector amina (preferentemente X es -H o un grupo protector amina; con mayor preferencia, X es -H);

15

Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO₃M, -SO₂M o -OSO₃M (por ejemplo, Y es -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO₃M, -SO₂M o -OSO₃M), en donde M es -H o un catión tal como Na⁺ o K⁺;

20

R es -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG -(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero, de 1 a 24 y R^c es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono;

25

R' y R'' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, -OH, -OR, -NRR^g, -COR, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo opcionalmente sustituido que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos seleccionados de O, S, N y P, un grupo PEG -(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero de 1 a 24, preferentemente n es 2, 4 o 8; y R^g es -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG (CH₂CH₂O)_n-R^c;

30

X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, y un grupo protector amina;

Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

35

A y A' se seleccionan de -O- y -S-;

W' está ausente, o se selecciona de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- o -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

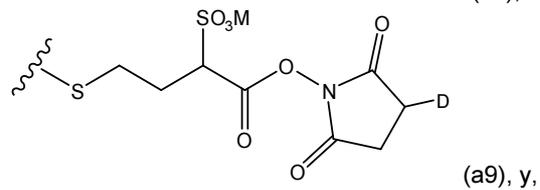
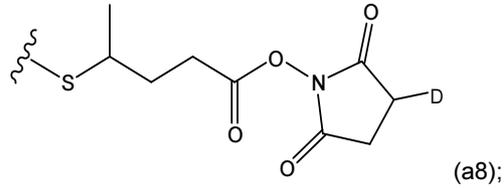
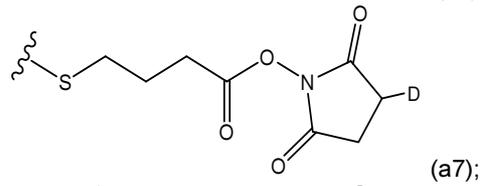
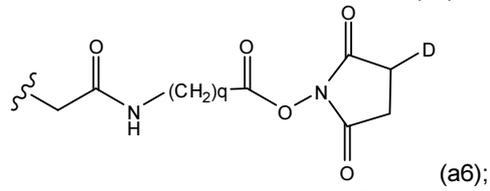
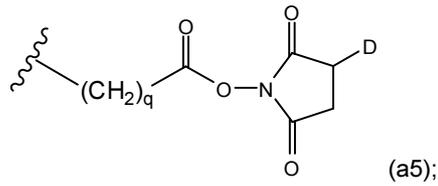
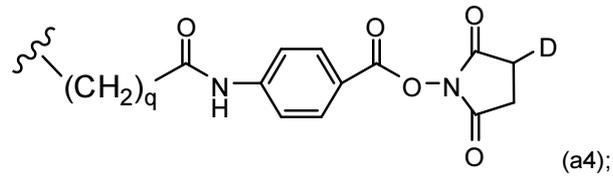
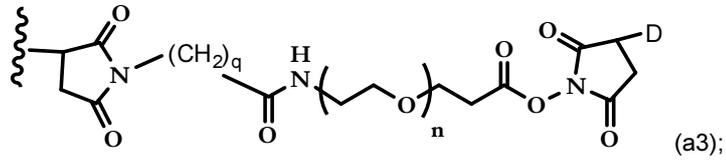
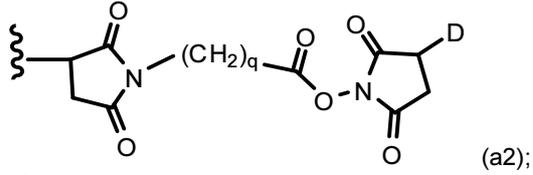
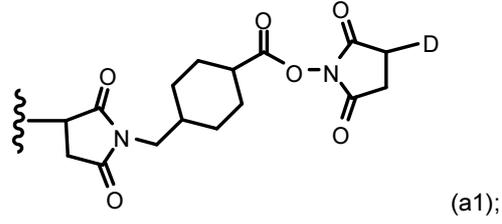
R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

R^e es -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un amino secundario (por ejemplo, -NHR¹⁰¹) o un grupo amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

40

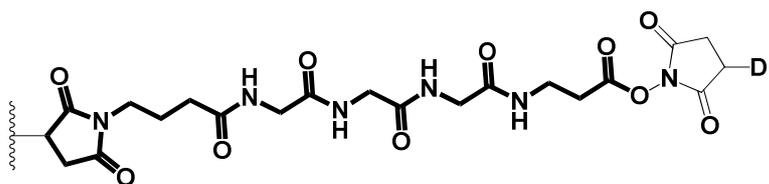
G se selecciona de -CH- o -N-;

Z^s es -H, o se selecciona de una cualquiera de las siguientes Fórmulas:



5

10

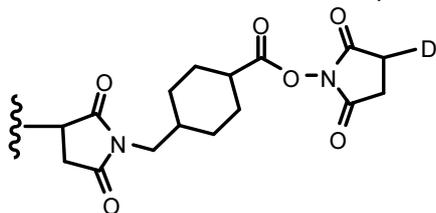


(a10),

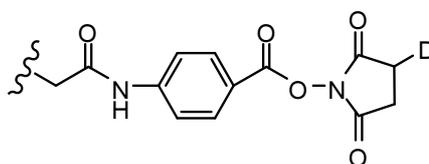
en donde:

- 5 q es un número entero de 1 a 5;
 n es un número entero de 2 a 6;
 D es -H o -SO₃M;
 M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺.

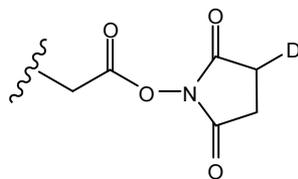
En ciertas realizaciones, Z^s se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



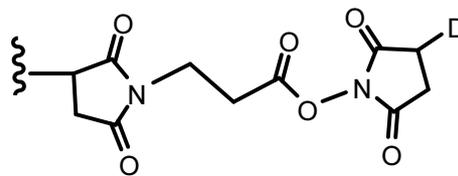
(a1);



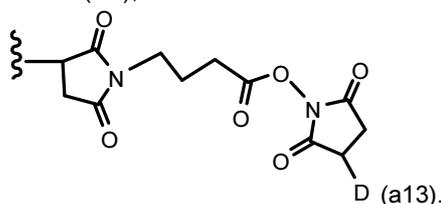
(a4');



(a5');



(a12);



(a13).

15 En ciertas realizaciones, W^r es -N(R^e)-.

En ciertas realizaciones, R^e es -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

20 En ciertas realizaciones, R^k es -H o -Me, n es 4, y q es 2,

En ciertas realizaciones, R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

25 En ciertas realizaciones, R^x puede ser -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, en donde R^f y R^g se selecciona cada uno independientemente de H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y p es 0, 1, 2 ó 3,

En ciertas realizaciones, R^f y R^g son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H y -Me; y p es 1,

30 En una décima realización específica, los compuestos de la Fórmula (VIII), (X) y (XI) descritos en la novena realización específica, las variables son como las descritas más abajo:

- 35 la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X sea -H; Y es -H, -OH o -SO₃M;
 M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, Na⁺);
 X' e Y' son ambos -H;
 A y A' son ambos -O-;
 R₆ es -OMe; y
 R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

40 En una realización relacionada, Y es -OH o -SO₃M.

En otra realización, los compuestos de la Fórmula (VIII), (X) y (XI) descritos en la novena realización específica, las

variables son como las descritas más abajo:

W¹ es -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(COR^e)-, -S- o -CH₂-S-;

R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono;

R^e es -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino primario, secundario o terciario o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina;

n es un número entero de 1 a 24; y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la novena realización específica.

Preferentemente, R^k es -H o -Me, y n es un número entero de 2 a 8, Preferentemente, R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

Preferentemente, R^x es -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, en donde R^f y R^g se seleccionan cada uno independientemente de H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; p es 0, 1, 2 ó 3, Con mayor preferencia, R^f y R^g son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H y -Me; y p es 1,

En otra realización preferida, el enlazador se representa por una cualquiera de la fórmula seleccionada de las Fórmulas (a1), (a4), (a5), (a10) y (a11) mostradas anteriormente; y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la décima realización específica.

En una undécima realización específica, para los compuestos de la Fórmula (IB), (IIIB) y (IVB) descritos en la octava realización específica, las variables son como las descritas más abajo:

la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X sea -H; Y es -H, -OH o -SO₃M (por ejemplo, Y es -OH o -SO₃M);

M es -H o Na⁺;

X' e Y' son ambos -H;

A y A' son ambos -O-;

R₆ es -OMe;

R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; y el resto de las variables es como se describió anteriormente en la tercera, cuarta, o la quinta realización específica.

Preferentemente, R^x es -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, en donde R^f y R^g se seleccionan cada uno independientemente de H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; p es 0, 1, 2 ó 3, Con mayor preferencia, R^f y R^g son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H y -Me; y p es 1,

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (por ejemplo, la primera a la 11ª realizaciones específicas), la doble línea == entre N y C puede representar un doble enlace.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (por ejemplo, la primera a la 11ª realizaciones específicas), la doble línea == entre N y C puede representar un enlace simple, X es

-H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o un grupo protector amina (por ejemplo, X es -H o un grupo protector amina); e Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, -SO₃M, -SO₂M y un sulfato -OSO₃M (por ejemplo, Y es -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, -SO₃M, -SO₂M y un sulfato -OSO₃M).

En ciertas realizaciones, Y se selecciona de -H, -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH (por ejemplo, Y es -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH).

En ciertas realizaciones, Y es -H, -SO₃M o -OH (por ejemplo, Y es -SO₃M o -OH).

En ciertas realizaciones, M es -H, Na⁺ o K⁺.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (por ejemplo, la primera a la 11ª realizaciones específicas), W, cuando está presente, es C=O.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (por ejemplo, la primera a la 11ª realizaciones específicas), Z y Z', cuando están presentes, son -CH₂.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (por ejemplo, la primera a la 11ª realizaciones específicas), X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, el grupo de enlace con el grupo reactivo

unido a este, y un grupo protector amina.

En ciertas realizaciones, X' es -H, -OH, -Me o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste.

5 En ciertas realizaciones, X' es -H.

En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (*por ejemplo*, la primera a la 11ª realizaciones específicas), Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

10

En ciertas realizaciones, Y' es -H u oxo.

En ciertas realizaciones, Y' es -H.

15 En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (*por ejemplo*, la primera a la 11ª realizaciones específicas), A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan de O, S, NR₅ y oxo (C=O). A y A' pueden ser iguales o diferentes y seleccionados de -O- y -S-. Preferentemente, A y A' son -O-.

20 En cualquiera de las realizaciones específicas anteriores (*por ejemplo*, la primera a la 11ª realizaciones específicas), D y D', cuando están presentes, son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, en donde n es un número entero de 1 a 24, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, o un alquilo, alquenilo, o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en halógeno, -OR, -NR'COR'', -SR y -COR'. Preferentemente, D y D' son un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono.

25

En una decimosegunda realización, el compuesto citotóxico de la presente invención como se describe en la primera, tercera y novena realización se representa por lo siguiente:

30 la doble línea == entre N y C representa a doble enlace;

Y es -H;

W es C=O;

R₁, R₂, R_{1'}, R_{2'}, R₄ y R_{4'} son -H;

uno de R₃, o R_{3'} es opcionalmente el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a este y el otro es -H;

35

R₆ es -OMe;

Z y Z' son -CH₂;

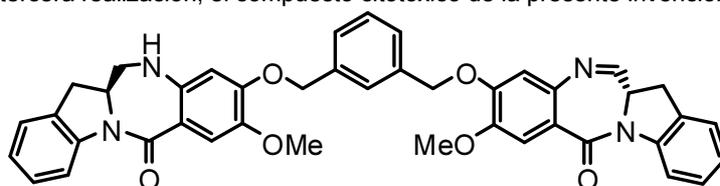
X' es -H;

Y' es -H; y

A y A' son -O-.

40

En una decimotercera realización, el compuesto citotóxico de la presente invención es:



(compuesto **29b**),

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

45 En una realización, el compuesto **29b** puede usarse en métodos de la presente invención descritos en la presente. En una realización preferida, el compuesto **29b** puede usarse para tratar un trastorno proliferativo, tal como cáncer.

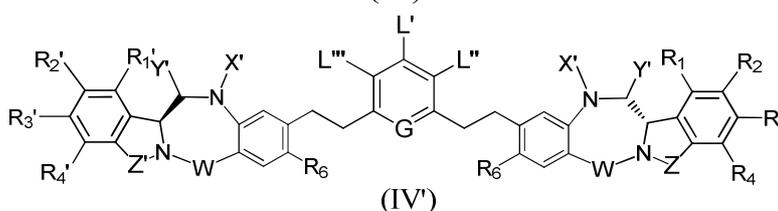
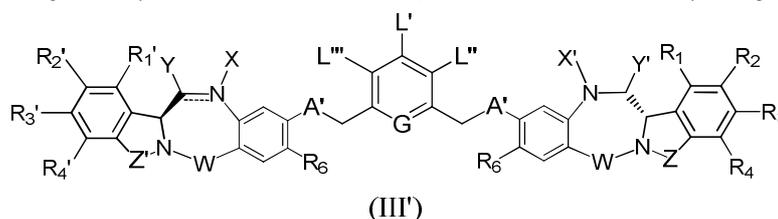
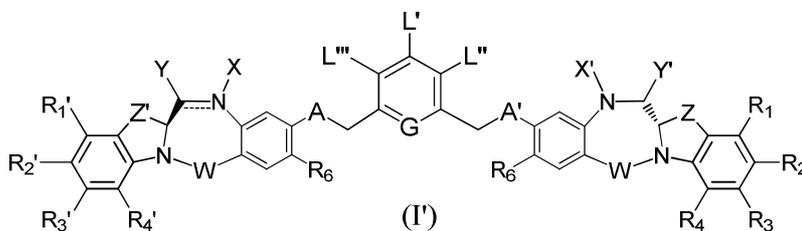
50 En otra realización, el compuesto **29b** puede usarse para cribar líneas celulares para identificar líneas celulares que son sensibles a los compuestos de benzodiazepina, tales como derivados de benzodiazepina descritos en la presente descripción.

COMPUESTOS FÁRMACOS Y COMPUESTOS FÁRMACO-ENLAZADOR

55 Los compuestos citotóxicos descritos anteriormente comprenden un grupo de enlace con un grupo reactivo unido a éste, compuestos que pueden resultar de hacer reaccionar un reactivo de entrecruzamiento bifuncional con compuestos "menos enlazadores" para formar los compuestos denominados fármaco-enlazador. Alternativamente, los compuestos fármacos que son de cualquier otra forma idénticos con los compuestos fármaco-enlazador, pero sin la porción enlazadora se describen además en la presente.

60

Así, en la presente se describen compuestos citotóxicos sin grupos de enlace, pero que pueden ser capaces de reaccionar con un agente de entrecruzamiento bifuncional para formar un compuesto de la invención, tal como uno cualquiera de las realizaciones específicas 1ª a la 12ª descritas anteriormente; o para formar un conjugado agente de unión celular de la invención (tales como aquellos descritos más abajo). Un compuesto citotóxico ilustrativo menos enlazador de la invención incluye el compuesto **29b** de la realización específica 13ª anterior. Los compuestos citotóxicos menos enlazadores de la invención se representan por una cualquiera de las fórmulas siguientes (I'), (III') o (IV'):



10 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

15 la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace, X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, o una porción protectora amina; preferentemente, la doble línea \equiv entre N y C representa a doble enlace;

20 Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido, en donde M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺. Preferentemente, M es -H o Na⁺. Preferentemente, Y se selecciona de -SO₃M, -OH,

25 -OMe, -OEt o -NHOH. Con mayor preferencia, Y es -SO₃M o -OH; o, Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiosulfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fosforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de estos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(R)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; Rⁱ puede ser además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo; preferentemente, Y es un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito un metabisulfito, o sales de éstos (tal como sal sódica);

30 R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P; R' y R'' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, -OH,

35 -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que

- tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono;
- 5 n es un número entero de 1 a 24;
- W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO, y SO₂;
- X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un grupo protector amina, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono (*por ejemplo*, fenilo), un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P. Preferentemente, X' es -H, -OH, o -Me. Con mayor preferencia, X' es -H;
- 10 Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos. Preferentemente, Y' se selecciona de -H o oxo. Con mayor preferencia, Y' es -H;
- 15 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁' R₂' R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$, halógeno, guanidinio $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', y -OCONR'R''. Preferentemente, 1, 2, 3, o todos los R₂, R₃, R₂' y R₃' es -H;
- 20 R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno, -OR^c o -SR^c, en donde R^c es -H, un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, R₆ es -OMe o -SMe. Aún con mayor preferencia, R₆ es -OMe;
- 25 Z y Z' se seleccionan independientemente de $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2)_{n_a}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-NR}_9\text{-(CH}_2)_{n_a}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-O-(CH}_2)_{n_a}\text{-}$ y $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-S-(CH}_2)_{n_a}\text{-}$; n' y n_a son iguales o diferentes, y se seleccionan seleccionados de 0, 1, 2 y 3;
- 30 R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n'}\text{-}$, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;
- 35 R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n'}\text{-}$;
- A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo (C=O-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅-) y -CRR'N(R₅-). Preferentemente, A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -O- y -S-. Con mayor preferencia, A y A' son -O-;
- 40 R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- L', L'', y L''' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, halógeno, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, -NO₂, o -CN;
- 45 G se selecciona de -CH- o -N-.

En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

- 50 En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X se seleccione de -H, o un grupo protector amina (preferentemente X es -H); W es C=O; R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' son -H; Z y Z' son -CH₂-; A y A' son los dos -O-; W es (C=O)-; G es -CH-; R₆ es -H, o C1-C10 alquilo lineal, C1-C10 ramificado, o C3-C7 cíclico opcionalmente sustituido, -O-alquilo, o -O-halo-alquilo, tales como -OMe; X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, y un grupo protector amina; e Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

- 60 Preferentemente, cuando Y no es -H, Y se selecciona de -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO₃M, -SO₂M, o -OSO₃M, en donde M es -H o un catión tal como Na⁺. K⁺. Preferentemente, Y se selecciona de -H, -OH, -OMe, -OEt, -NHOH o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -OH, -OMe, -OEt, -NHOH o -SO₃M). Aún con mayor preferencia, Y es -H, -OH o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -OH o -SO₃M), preferentemente M es -H o Na⁺.

- 65 En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X se seleccione de -H, o un

grupo protector amina (preferentemente X es -H); W es C=O; R₁, R₂, R₃, R₄, R_{1'}, R_{2'}, R_{3'}, R_{4'}, X' e Y' son -H; Z y Z' son -CH₂-; A y A' son ambos -O-; W es -(C=O)-; G es -CH-; R₅ es -H, o C1-C10 alquilo lineal, C1-C10 ramificado, o C3-C7 cíclico opcionalmente sustituido, -O-alquil, o -O-halo-alquilo, tal como -OMe.

5 Los agentes de entrecruzamiento bifuncionales pueden ser cualquier enlazador bifuncional conocido en la técnica. Por ejemplo, los enlazadores bifuncionales que pueden usarse para preparar los compuestos de unión al fármaco son aquellos que forman enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de ésterasa con los compuestos citotóxicos (ver, por ejemplo, Patente US 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 y 7,414,073, Preferentemente, los agentes de entrecruzamiento bifuncionales son los que forman enlaces disulfuro, tioéter y enlaces lábiles de peptidasa con los compuestos citotóxicos. Otros agentes de entrecruzamiento bifuncionales que pueden usarse en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, tales como los descritos en la publicación U.S. número US 2005/0169933, o enlazadores cargados o enlazadores hidrófilos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976, Los agentes de entrecruzamiento bifuncionales que pueden usarse para preparar los compuestos de (fármaco-enlazador) de la presente invención incluyen además los descritos en *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*.

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS CITOTÓXICOS

20 Los procesos representativos para preparar los compuestos dímeros citotóxicos de la presente invención se muestran en las FIGS. 1-11, Los dímeros se prepararon haciendo reaccionar el monómero con los compuestos enlazadores que poseen dos grupos salientes tales como halógeno, triflato, mesilato, o tosilato tal como se describe para la síntesis de **1c** en la FIG. 1, Las síntesis de dímeros representativos que portan una porción tiol o disulfuro para permitir el enlace con los agentes de unión celular a través de enlaces reducibles o no reducibles se muestran en las FIGS. 1-5, 7, 8, y 10, En la FIG. 1 un enlazador que contiene una porción corta de polietilenglicol y un disulfuro alquilo se preparó a través de aminación reductora de **1a**. La conversión de **1b** a su correspondiente mesilato y acoplamiento con la unidad monomérica IBD (indolinobenzodiazepina) proporcionó el dímero **1c** que se redujo a la mono-imina, se convirtió al tiol libre, y se acopló con **2** para dar el compuesto **1g** de la presente invención. En la FIG. 3, una forma modificada del monómero IBD se preparó y acopló para dar un dímero de la presente invención en el que la imina reducida se convirtió en un enlazador. La FIG. 4 describe el dímero que posee una porción corta de polietilenglicol y un disulfuro amida que se redujo a tiol **4c** y convirtió en un éster reactivo. La FIG. 5 describe la síntesis de disulfuro piridilo que contiene el enlazador **5e** que se convirtió en el tiol mono-imina **5i** de la presente invención antes de convertirse en un éster reactivo. Las síntesis de los dímeros representativos que poseen enlazadores que pueden reaccionar con agentes de unión celular se preparan al convertir los metil ésteres en los ésteres reactivos correspondientes de un grupo saliente tal como, pero sin limitarse a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxi-ftalimida, ésteres de N-hidroxi sulfo-succinimida, para-nitrofenil ésteres, pentafluorofenil ésteres se muestran en las FIGS. 6, 9, y 11,

40 Los procesos representativos para preparar los compuestos dímeros citotóxicos de la presente invención adecuados para la conjugación en una etapa con un agente de unión celular se muestran en las FIGS. 1 y 12-19, En todos estos ejemplos un dímero que contiene una porción tiol reacciona con un reactivo de entrecruzamiento bifuncional que posee un grupo reactivo tal como, pero sin limitarse a, un tiopiridilo, una maleimida, yoduro, bromuro, o tosilato en un lado y un sustituyente reactivo adecuado para la reacción con un agente de unión celular tal como, pero sin limitarse a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxi-ftalimida, ésteres de N-hidroxi sulfo-succinimida, ésteres de paranitrofenilo, ésteres de de pentafluorofenilo.

50 Los procesos sintéticos alternativos para la preparación de compuestos dímeros citotóxicos representativos de la presente invención se muestran en las FIGS. 20-21, En la FIG. 20, la síntesis del dímero mono reducido (*es decir*, que tiene un grupo imina) se logra mediante un método de acoplamiento en dos etapas, en el que una forma reducida del monómero se acopla inicialmente ya sea al enlazador seguido por el acoplamiento con el monómero de IBD o el dímero se prepara usando una mezcla tanto de monómero reducido como del monómero de IBD en el acoplamiento con el enlazador reactivo. Mientras que el dímero di-reducido es potencialmente un subproducto de la segunda ruta sintética descrita anteriormente, una ruta más directa se muestra en la FIG. 21 en la que el monómero reducido se acopla a ambos directamente con el enlazador.

AGENTES DE UNIÓN CELULAR

60 La eficacia de los conjugados de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión celular adecuado. Los agentes de unión celulares pueden ser de cualquier tipo actualmente conocido, o que se conozcan e incluye péptidos y no-péptidos. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales), linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas (tales como folato *etc.*, que pueden unirse a un receptor de superficie celular de éstos, *por ejemplo*, un receptor de folato), moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

65

En ciertas realizaciones, los agentes de unión celular son proteínas o polipéptidos, o compuestos que comprenden proteínas o polipéptidos. Preferentemente, las proteínas o polipéptidos comprenden uno o más residuos Lys con grupos -NH₂ de cadena lateral. Alternativamente o adicionalmente, las proteínas o polipéptidos comprenden uno o más residuos Cys. Los grupos -SH de cadena lateral de los residuos Cys pueden estar intactos, o pueden estar en un enlace disulfuro que puede reducirse. Preferentemente, la reducción del(de los) enlace(s) disulfuro no impacta significativamente de forma negativa en la función de unión celular de las proteínas o polipéptidos (*por ejemplo*, en el caso de la porción de unión del anticuerpo o antígeno de estos, la reducción de los enlaces disulfuro no aumenta sustancialmente la disociación de cadenas ligeras / cadenas pesadas).

Los grupos -NH₂ de la cadena lateral de Lys y/o los grupos -SH de la cadena lateral de Cys pueden unirse covalentemente a los enlazadores, que son a su vez enlazados a los compuestos dímeros de la invención, conjugando así los agentes de unión celular a los compuestos dímeros de la invención. Cada uno de los agentes de unión celular basados en proteína pueden contener múltiples grupos -NH₂ de cadena lateral de Lys y/o grupos -SH de cadena lateral de Cys disponibles para enlazar los compuestos de la invención a través de los agentes de entrecruzamiento bifuncionales.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión celular que pueden usarse incluyen:

anticuerpos policlonales;
 anticuerpos monoclonales;
 fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', y F(ab')₂, Fv, minicuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos (Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring *et al. J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960), Kim *et al., Mol. Cancer Ther.*, 7 : 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6 : 343-357 (2006));
 interferones (*por ejemplo* α, β, γ);
 linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
 hormonas tales como insulina, TRH (hormona liberadora de tirotropina), MSH (hormona estimulante de los melanocitos), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos;
 factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias tales como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984));
 transferrina (O'Keefe *et al. J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985));
 vitaminas, tal como folato;
 Soportes de proteína basados en una secuencia consenso de repeticiones de fibronectina tipo III (FN3) (conocido además como Centyrins; Ver la Publicación de Patente U.S. 2010/0255056);
 Proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPs; Solicitudes de Patente U.S. Nos. 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100), C. Zahnd *et al.* 2010, *Cancer Res.*, 70; 1595-1605); y,
 Proteínas de soporte con dominio de fibronectina (Adnectinas: Solicitudes de Patente US Nos. 20070082365; 20080139791).

Las técnicas de los anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. Particularmente son bien conocidas en el estado de la técnica, las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos mediante inmunización de ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés, tal como la célula diana intacta, los antígenos aislados a partir de la célula diana, los virus enteros, los virus enteros atenuados, y las proteínas virales, tales como las proteínas de la cubierta viral. Las células humanas sensibilizadas también se pueden usar. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de genotecas de fagos de scFv (región variable de cadena sencilla), específicamente los scFv humanos (*ver, por ejemplo*, Griffiths *et al.*, Patentes U.S. Nos. 5,885,793 y 5,969,108; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587). Adicionalmente, los anticuerpos revestidos descritos en la Patente U.-S. No. 5,639,641 pueden usarse además, como pueden hacerlo los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. La selección del agente de unión celular adecuado es una cuestión de elección que depende de la población celular particular que se enfoca, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos si está disponible uno adecuado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG1 murino que se une específicamente al Antígeno CD33 { J.D.Griffin *et al* 8 *Leucemia Res.*, 521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielógena aguda (AML). El agente de unión celular puede ser cualquier compuesto que se puede unir una célula, ya sea de una manera específica o no específica. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos), interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

Cuando el agente de unión celular es un anticuerpo, éste se une a un antígeno que es un polipéptido y puede ser una molécula transmembrana (*por ejemplo*, un receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ilustrativos incluyen moléculas como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humano y la hormona de crecimiento bovino; factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de

insulina; proinsulina; hormona estimuladora de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor vmc, factor IX, factor tisular (TF), y factor de von Willebrand; factores anti-coagulantes tales como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como la uroquinasa o la orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor-alfa y -beta de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación); proteína humana inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como la albúmina de suero humano; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como el CTLA-4; inhibina; activina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT4, NT,-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tales como aFGF y bFGF; receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2) factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, que incluye TGF-β1, melanotransferrina, TGF-α2, TGF-α3, TGF-α4, o TGF-α5; factor de crecimiento similar a la insulina -I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, receptores EphA, receptores EphB, receptor de folato, FOLR1, mesotelina, cripto, α v β 6, integrinas, VEGF, VEGFR, EGFR, receptor de transferrina, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 o un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados al tumor o receptores de superficie celular descritos en la Publicación US No. 20080171040 o la Publicación US No. 20080305044; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma, factores estimulantes de colonias (CSF) *por ejemplo*, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), *por ejemplo*, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa, receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor de aceleración de decadencia; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del VIH; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM c-kit, un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; endoglina, c-Met, 1GF1R, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4, y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados.

Además, GM-CSF, que se une a células mieloides puede usarse como un agente de unión celular para células enfermas de leucemia mielógena aguda. IL-2 que se une a células T activadas puede usarse para la prevención del rechazo de trasplante del injerto, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra huésped, y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. La MSH, que se une a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento del melanoma, como pueden dirigirse los anticuerpos hacia los melanomas. El ácido fólico puede usarse para enfocar el receptor de folato expresado en el ovario y otros tumores. El factor de crecimiento epidérmico puede usarse para enfocar los cánceres escamosos tales como de pulmón y de cabeza y cuello. La somatostatina puede usarse para enfocar los neuroblastomas y otros tipos de tumores.

Los cánceres de mama y testículos pueden enfocarse exitosamente con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno), respectivamente, como agentes de unión celular.

En una realización, el agente de unión celular son los anticuerpos monoclonales humanizados. En otra realización, el agente de unión celular es huMy9-6 u otros anticuerpos relacionados, que se describen en las Pat. U.S. Nos. 7,342,110 y 7,557,189, En otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-receptor de folato descrito en las Solicitudes Provisionales U.S. Nos. 61/307,797, 61/346,595, 61/413,172 y la Solicitud U.S. No. 13/033,723 (publicada como US 2012-0009181 A1).

En ciertas realizaciones, el agente de unión celular puede ser un anticuerpo monoclonal o porciones de unión al antígeno de éstos que comparten secuencias críticas para la unión al antígeno con un anticuerpo descrito en la presente, tales como huMy9-6 o sus anticuerpos relacionados descritos en las Pat. U.S. Nos. 7,342,110 y 7,557,189, Estos anticuerpos derivados pueden tener sustancialmente la misma o idéntica (1) regiones CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada, (2) regiones CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada, o (3) regiones de cadena ligera y/o cadena pesada, en comparación con un anticuerpo descrito en la presente. Las secuencias dentro de estas regiones pueden contener sustituciones conservativas de aminoácidos, que incluyen sustituciones dentro de estas regiones CDR. Preferentemente, no hay más de 1, 2, 3, 4, ó 5 sustituciones conservativas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos derivados tienen una región de cadena ligera y/o una región de cadena pesada que es al menos aproximadamente 90%, 95%, 99% ó 100% idéntica a un anticuerpo descrito en la presente. Estos anticuerpos derivados pueden tener sustancialmente la misma especificidad de unión y/o afinidad al antígeno diana en comparación con un anticuerpo descrito en la presente. Preferentemente, los valores K_d y/o k_{off} de los anticuerpos derivados están dentro de 10 veces (ya sea superior o inferior), 5 veces (ya sea superior o inferior), 3 veces (ya sea superior o inferior) ó 2 veces (ya sea superior o inferior) de un anticuerpo descrito en la presente. Estos anticuerpos derivados pueden ser anticuerpos completamente humanos, o anticuerpos humanizados, o anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos derivados pueden producirse de acuerdo con cualquiera de los métodos reconocidos en la técnica.

En una realización, el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste que se une específicamente a un receptor 1 humano de folato, en donde el anticuerpo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa1FXaa2Xaa3 (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 5); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); en donde Xaa1 se selecciona de K, Q, H, y R; Xaa2 se selecciona de Q, H, N, y R; y Xaa3 se selecciona de G, E, T, S, A, y V. Preferentemente, la secuencia de CDR2 de la cadena pesada comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

En otra realización, el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste que se une específicamente al receptor 1 humano de folato que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSS NTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

En otra realización, el anticuerpo anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste codificado por el ADN de plásmido depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene núms. de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 ó 10774,

En otra realización, el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste que se une específicamente al receptor 1 humano de folato que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de DIVLTQSPLSLAVSLGQPAAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); o DIVLTQSPLSLAVSLGQPAAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

En otra realización el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste que se une específicamente al receptor 1 humano de folato que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO: 9 o (SEQ ID NO: 10, Preferentemente, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO: 8 y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

En otra realización, el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste codificado por el ADN del plásmido depositado en la ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene núms. de depósitos de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 ó 10774.

En otra realización, el anticuerpo anti-receptor de folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de éste que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos aproximadamente 90%, 95%, 99% ó 100% idéntico a

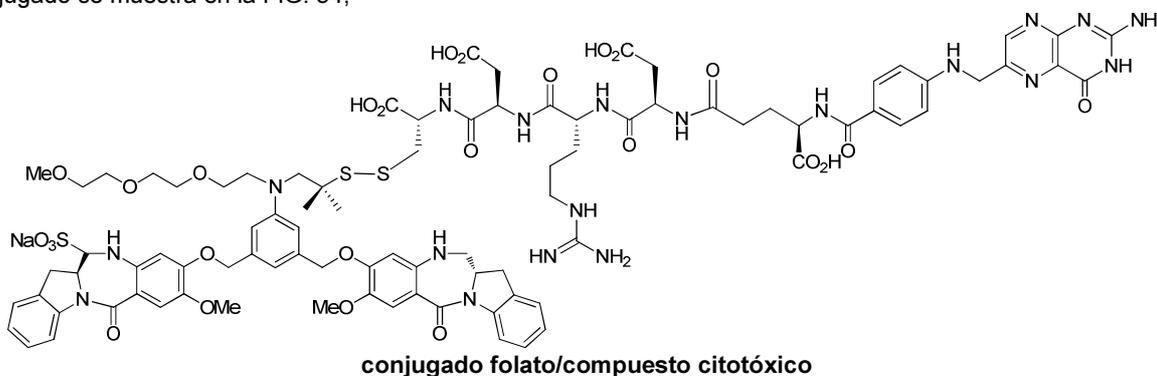
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSS NTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTITVSS (SEQ ID NO: 11), y un dominio variable de cadena ligera al menos aproximadamente 90%, 95%, 99% ó 100% idéntico a DIVLTQSPLSLAVSLGQPAAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 12); o DIVLTQSPLSLAVSLGQPAAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTI SPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

CONJUGADOS DE AGENTE DE UNIÓN CELULAR-FÁRMACO

La presente invención proporciona además conjugados del agente de unión celular-fármaco que comprenden un agente de unión celular unido a uno o más compuestos citotóxicos de la presente invención a través de una variedad de enlazadores, que incluyen, pero sin limitarse a, enlazadores disulfuro, enlazadores tioéter, enlazadores unidos amida, enlazadores lábiles con peptidasa, enlazadores lábiles en medio ácido, enlazadores lábiles con esterasa.

Los conjugados representativos de la invención son anticuerpo / compuesto citotóxico, fragmento de anticuerpo / compuesto citotóxico, factor de crecimiento epidérmico (EGF) / compuesto citotóxico, hormona estimulante de los

melanocito (MSH) / compuesto citotóxico, hormona estimulante de tiroides (TSH) / compuesto citotóxico, somatostatina/compuesto citotóxico, folato / compuesto citotóxico, estrógeno / compuesto citotóxico, análogo de estrógeno / compuesto citotóxico, andrógeno/compuesto citotóxico, y análogo andrógeno / compuesto citotóxico. Un conjugado representativo folato/compuesto citotóxico se representa más abajo, con el aducto opcional $-SO_3^-Na^+$ en el enlace imina de uno de los dos monómeros del fármaco. Un esquema de síntesis representativo para este conjugado se muestra en la FIG. 54,



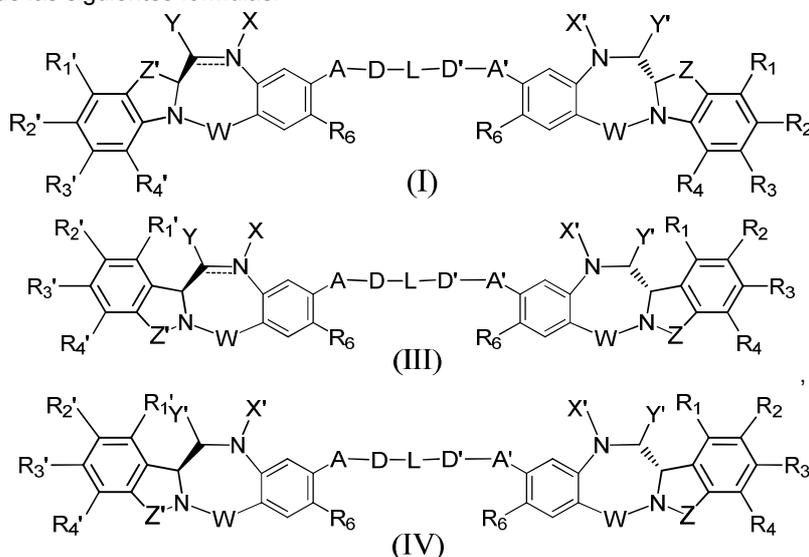
10 En una realización preferida, la presente invención proporciona conjugados que comprenden un compuesto dímero de indolinobenzodiazepina (*por ejemplo*, compuestos de la fórmulas (I)-(IV), (IA)-(IVA) y (IB)-(IVB)) y el agente de unión celular enlazado a través de un enlace covalente. El enlazador puede escindirse en el sitio de las células proliferantes no deseadas/ tumorales para suministrar el agente citotóxico a su diana en un número de maneras. El enlazador puede escindirse, por ejemplo, por un pH bajo (hidrazona), ambiente reductor (disulfuro), proteólisis

15 (enlace amida/péptido), o a través de una reacción enzimática (esterasa/glucosidasa).

En un aspecto preferido, los conjugados citotóxicos representativos de la invención son anticuerpo/compuestos dímero de indolinobenzodiazepina, fragmento de anticuerpo/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, factor de crecimiento epidérmico (EGF)/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, hormona estimulante de los melanocitos (MSH)/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, hormona estimulante de la tiroides (TSH)/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, somatostatina/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, folato/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, estrógeno/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, análogo de estrógeno/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (PSMA)/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, inhibidor de matriptasa/ compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, proteínas de repetición de ankirina diseñada (DARPs)/ compuesto dímero de indolinobenzodiazepina, andrógeno/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina y análogo de andrógeno/compuesto dímero de indolinobenzodiazepina.

Así, en la decimocuarta realización específica, la invención proporciona un conjugado que comprende: un

30 compuesto citotóxico y un agente de unión celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico comprende un grupo de enlace que une covalentemente el compuesto citotóxico al CBA, y en donde el compuesto citotóxico se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



35 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

- la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace, o una porción protectora amina;
- Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOR',
- 5 -OCOR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido; o,
- 10 Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiosulfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fósforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de éstos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(Rⁱ)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; Rⁱ puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterocíclico o heteroarilo; preferentemente, Y es un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito un metabisulfito, o sales de estos (tal como sal sódica);
- 20 M es -H o un catión;
- R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 25 R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 30 R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace;
- 35 n es un número entero de 1 a 24;
- W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO y SO₂;
- 40 X' se selecciona de -H, un grupo protector amina, el grupo de enlace, un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 45 Y' se selecciona de -H, un grupo oxo, el grupo de enlace, un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos;
- 50 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinoilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃⁻M⁺, un sulfato -OSO₃⁻M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCOR'R'' y el grupo de enlace;
- 55 R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno o el grupo de enlace;
- Z y Z' se seleccionan independientemente de -(CH₂)_n-, -(CH₂)_n-CR₇R₈-(CH₂)_{na}-, -(CH₂)_n-NR₉-(CH₂)_{na}-, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_{na}- y -(CH₂)_n-S-(CH₂)_{na}-;
- 60 n' y na' son iguales o diferentes, y se seleccionan de 0, 1, 2 y 3;
- R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;
- 65 R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-;
- A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo

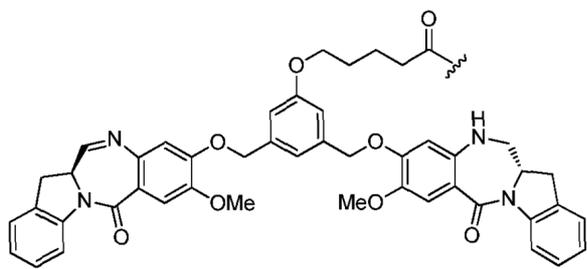
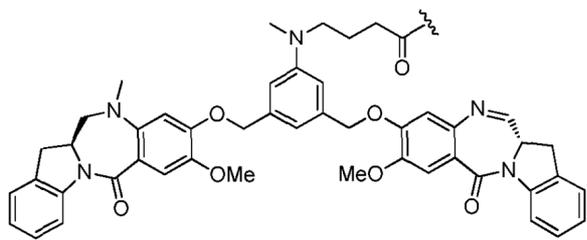
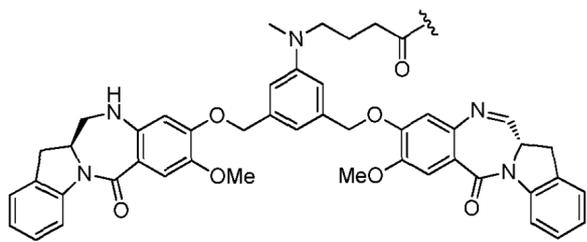
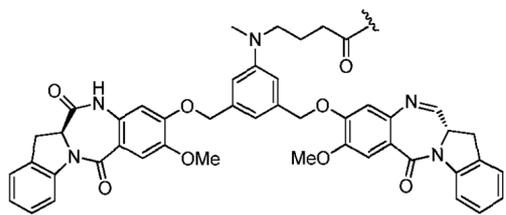
(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ y -CRR'N(R₅)-;

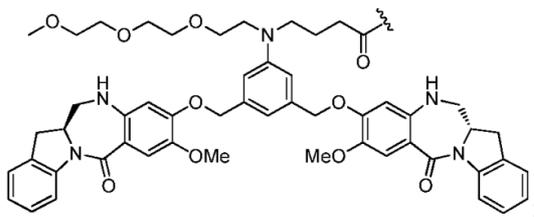
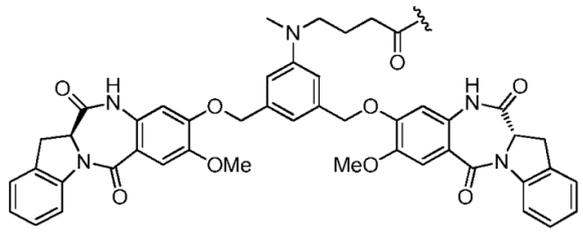
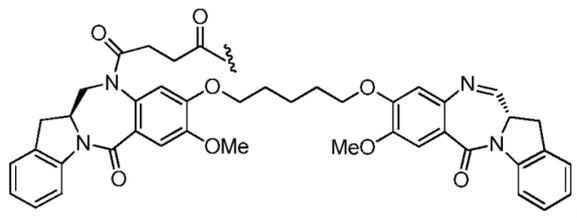
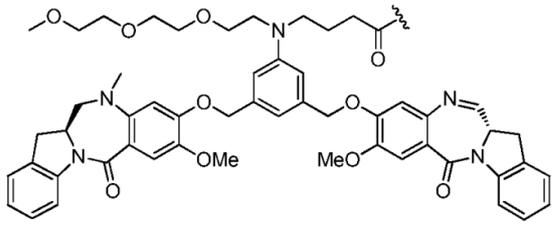
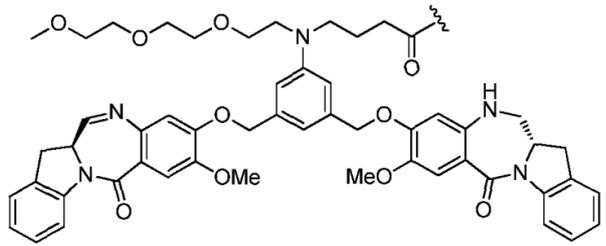
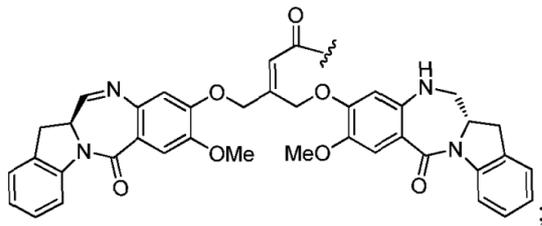
R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

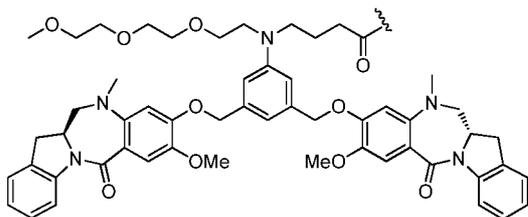
5 D y D' son iguales o diferentes, y están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n;

10 L está ausente, es el grupo de enlace, una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, un alquilo o alqueno lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alqueno es opcionalmente sustituido con el grupo de enlace; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace, en donde el compuesto no es uno de los compuestos descritos inmediatamente a continuación.

15 El compuesto no es ninguno de los compuestos siguientes:



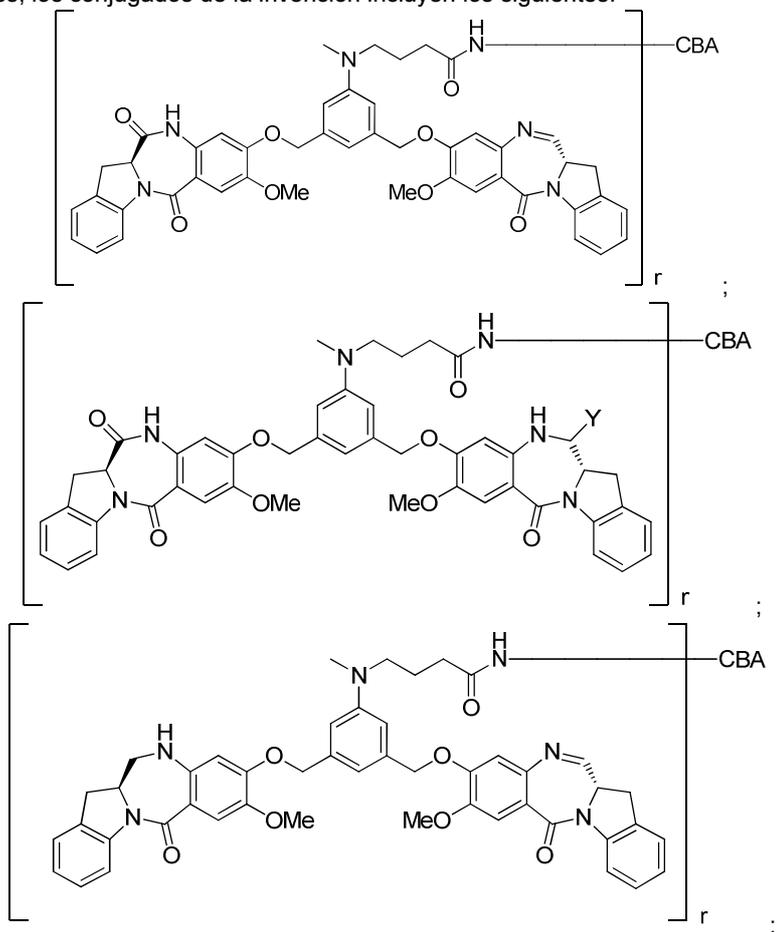




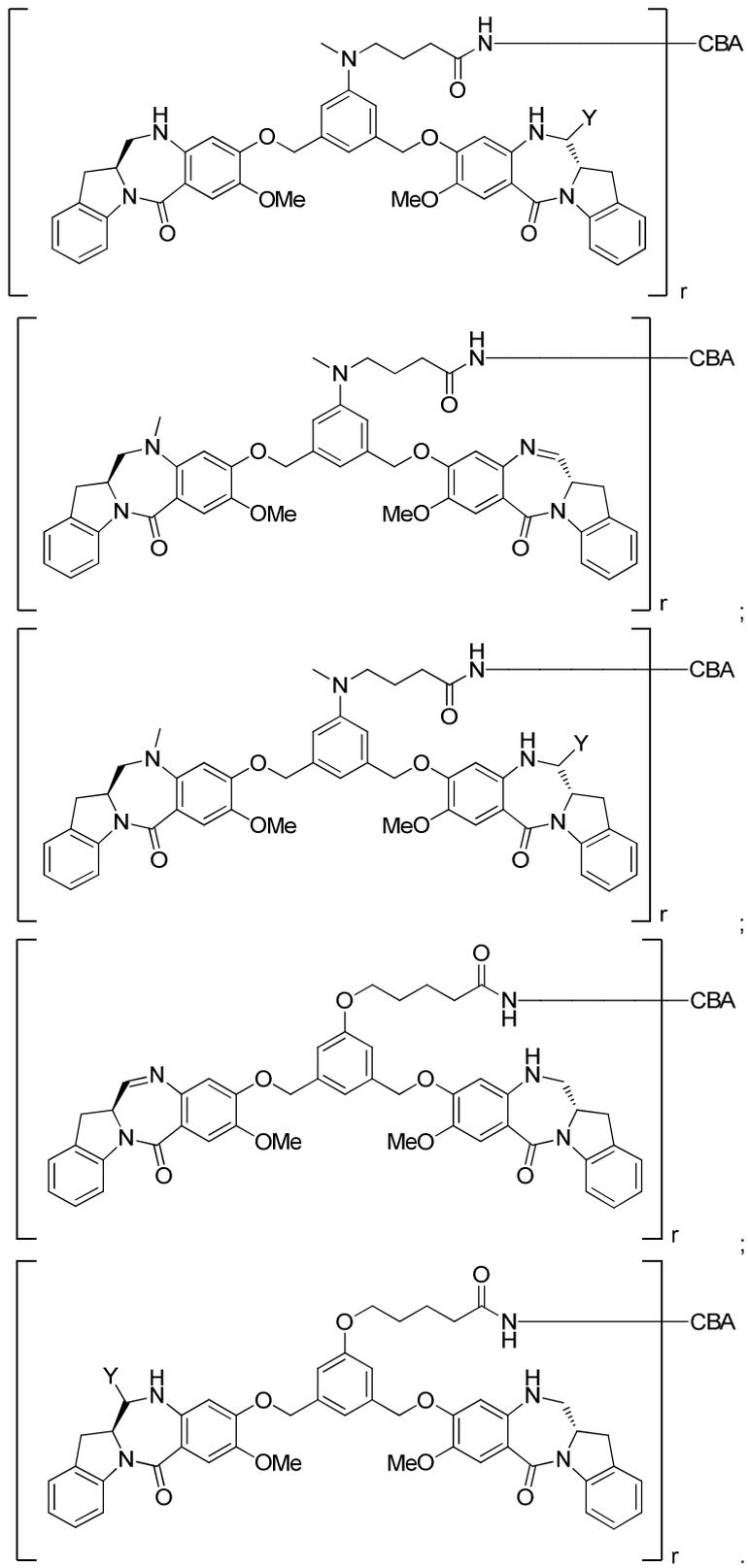
En ciertas realizaciones, X no es el grupo de enlace. En ciertas realizaciones, la doble línea == entre N y C representa un enlace simple, Y no es -H.

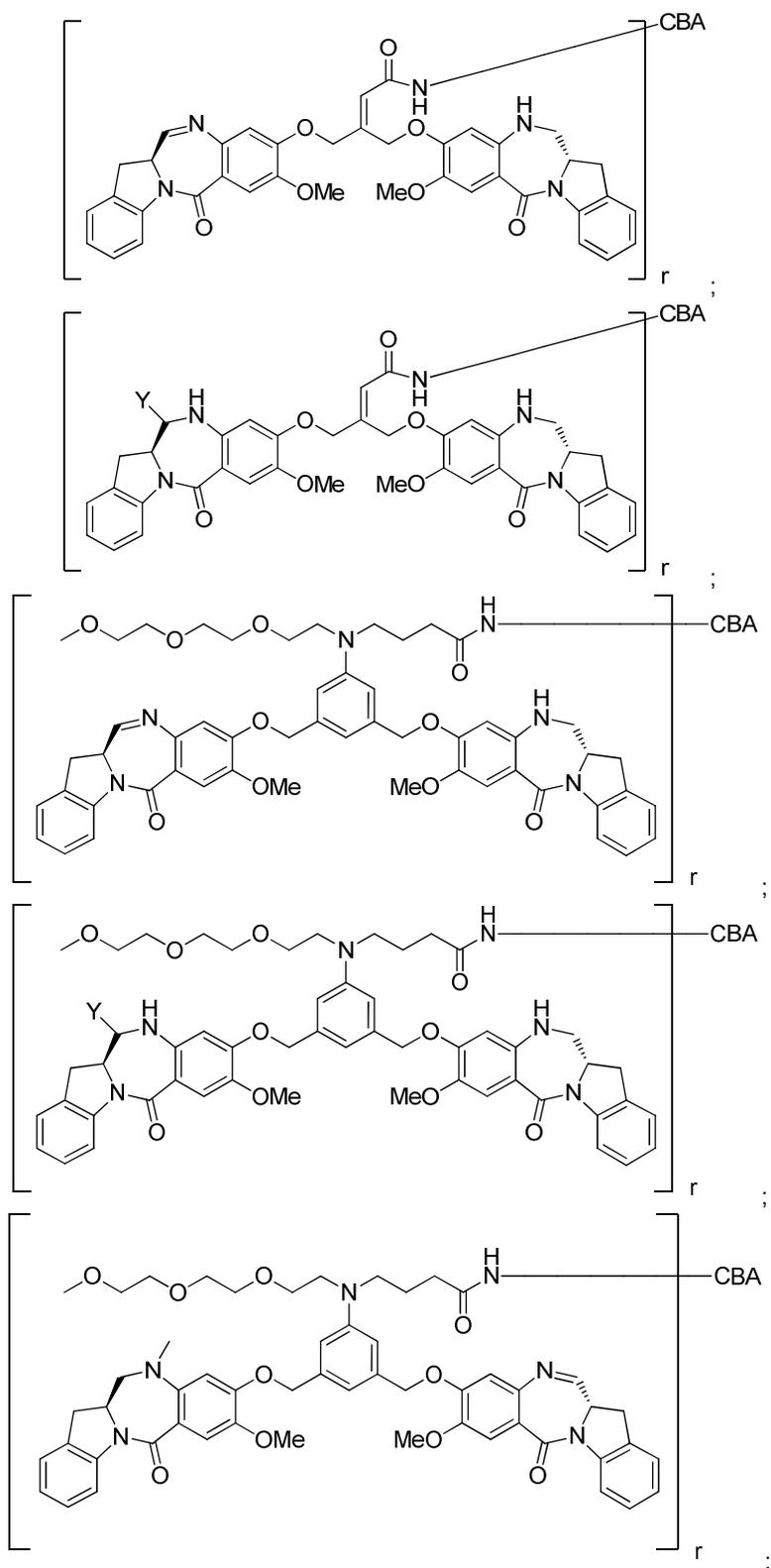
5 En ciertas realizaciones, Y es un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido.

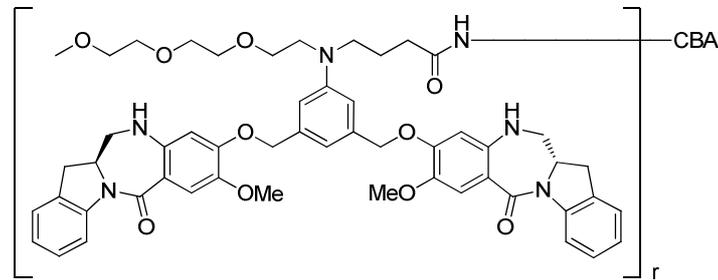
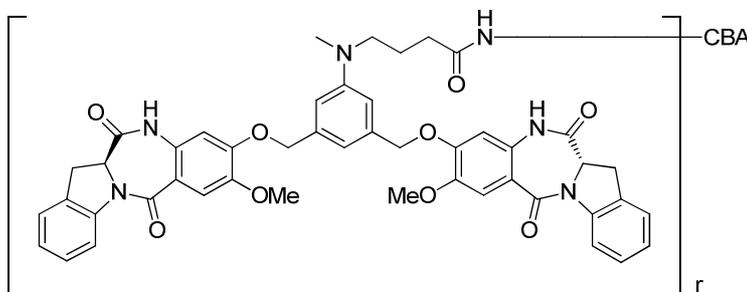
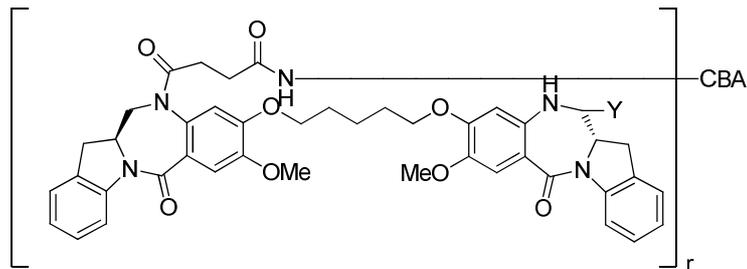
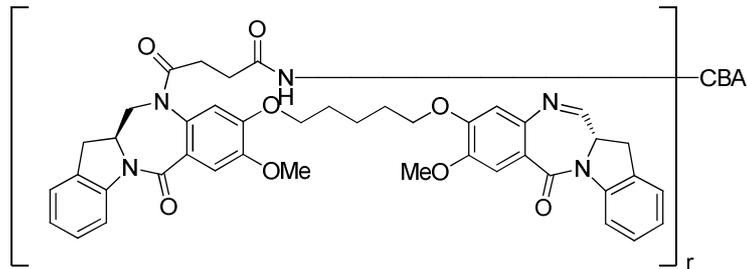
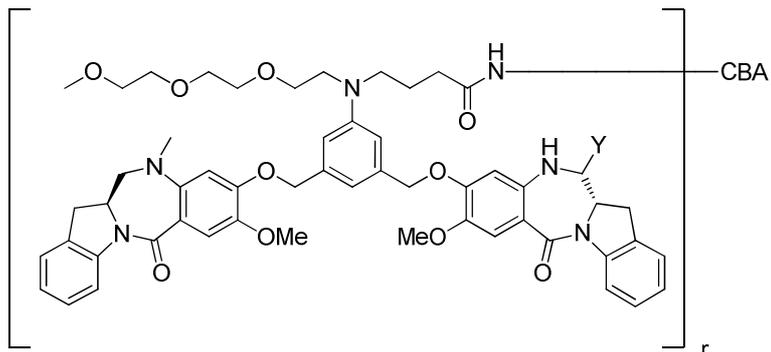
En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención incluyen los siguientes:

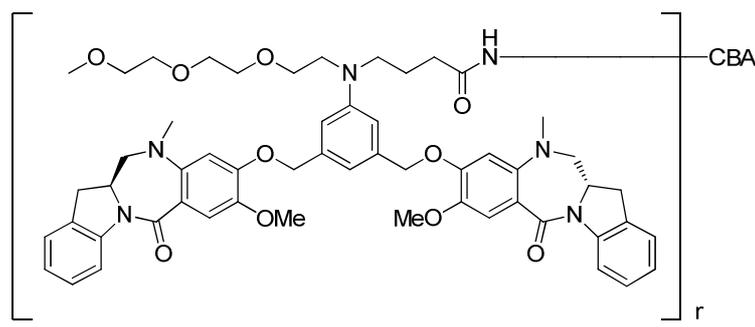


15







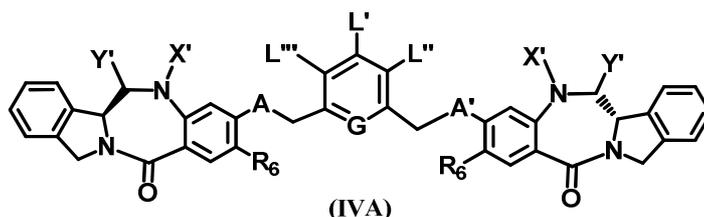
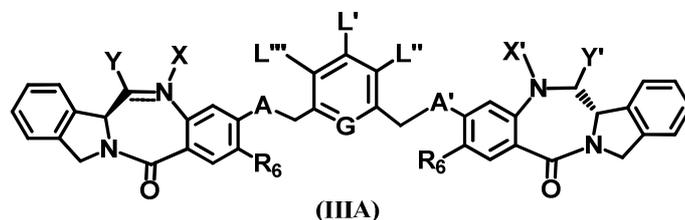
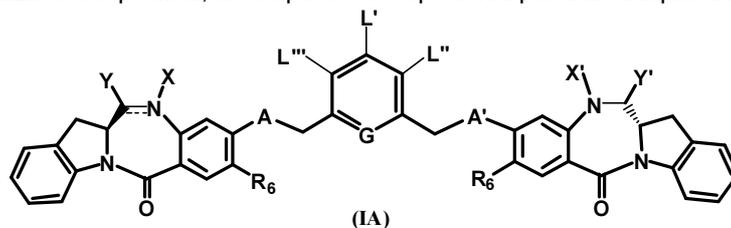


en donde:

- 5 CBA es el agente de unión celular, r es un número entero de 1 a 10, Y es -H, un aducto de un bisulfito, un hidrosulfito, o un metabisulfito, o sales de éstos, o -SO₃M, y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, L está ausente, o se selecciona de un grupo fenilo opcionalmente sustituido y un grupo piridilo opcionalmente sustituido, en donde el grupo fenilo y piridilo porta el grupo de enlace, o L es un grupo amina que porta el grupo de enlace (*es decir*, -N(grupo de enlace)-), o L es un alquilo o alquenilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y que porta el grupo de enlace.

En la decimoquinta realización específica, el compuesto se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



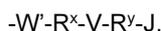
en donde:

- 20 L', L'', y L''' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M, un sulfato -OSO₃M, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' y el grupo de enlace, siempre que solo uno de L', L'', y L''' sea el grupo de enlace; y
- 25 G se selecciona de -CH- o -N-. Los grupos restantes son como se describieron en la décimo cuarta realización específica anterior.

En ciertas realizaciones, uno de L', L'', o L''' es el grupo de enlace, mientras los otros son -H. Preferentemente, L' es el grupo de enlace, y L'' y L''' son -H.

- 30 En ciertas realizaciones, A y A' son ambos -O-, R₆ es -OMe, y G es -CH-.

En la décimo sexta realización específica, L' se representa por la siguiente Fórmula:



en donde:

- 5 W' y V son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o se selecciona de $-CR^eR^{e'}$ -, $-O$ -, $-O-C(=O)$ -, $-C(=O)-O$ -, $-S$ -, $-SO$ -, $-SO_2$ -, $-CH_2-S$ -, $-CH_2O$ -, $-CH_2NR^e$ -, $-O-(C=O)O$ -, $-O-(C=O)N(R^e)$ -, $-N(R^e)$ -, $-N(R^e)-C(=O)$ -, $-C(=O)-N(R^e)$ -, $-N(R^e)-C(=O)O$ -, $-N(C(=O)R^e)C(=O)$ -, $-N(C(=O)R^e)$ -, $-(O-CH_2-CH_2)_n$ -, $-SS$ -, o $-C(=O)$ -, o un aminoácido, o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos;
- 10 R^x y R^y son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o es un alquilo, alqueniilo, o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que porta 6 a 10 átomos de carbono o un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que porta 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N o S;
- 15 R^e y $R^{e'}$ son iguales o diferentes, y se seleccionan de $-H$, un alquilo, alqueniilo, o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, en donde R^k es un $-H$, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino secundario (*por ejemplo*, $-NHR^{101}$) o amino terciario ($-NR^{101}R^{102}$) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R^{101} y R^{102} son cada uno independientemente un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono; preferentemente, R^{101} y R^{102} son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; n es un entero de 1 a 24; y
- 20 J está covalentemente unido a CBA, y se selecciona de una succinimida, un acetamido, $-S$ -, $-SS$ -, $-CH_2S$ -, $-CH(Me)S$ -, $-C(Me)_2S$ -, $-NR^{c1}$ -, $-CH_2NR^{c1}$ -, $-NR^{c1}N$ -, y $-C(=O)$ -, en donde R^{c1} es $-H$ o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

En ciertas realizaciones, J es $-S$ -, $-SS$ -, una succinimida, o $-C(=O)$ -.

- 30 En ciertas realizaciones, R^e es $-H$ o $-Me$; $R^{e'}$ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$; n es un número entero de 2 a 8; y R^k es $-H$, $-Me$ o $-CH_2CH_2-NMe_2$, y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la décimo quinta realización específica.

- 35 En ciertas realizaciones, V es un aminoácido o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos.

En ciertas realizaciones, V es valina-citulina, gly-gly-gly, o ala-leu-ala-leu.

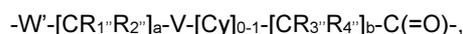
En ciertas realizaciones,

- 40 W' es $-O$ -, $-N(R^e)$ - o $-N(R^e)-C(=O)$ -;
- R^e es H , un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
- R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;
- V está ausente, es $-(O-CH_2-CH_2)_n$ -, $-C(=O)-NH$ -, $-S$ -, $-NH-C(=O)$ -;
- R^y está ausente o es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y
- 45 J es $-S$ -, $-SS$ -, o $-C(=O)$ -, y los grupos restantes son como los definidos en la décimo sexta realización específica.

En ciertas realizaciones,

- 50 W' es $-O$ -, $-N(R^e)$ - o $-N(R^e)-C(=O)$ -;
- R^e es $-H$, $-Me$, o $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$;
- n es un número entero de 2 a 6;
- R^x es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 6 átomos de carbono;
- V y R^y están ausentes; y
- J es $-C(=O)$ -. Los grupos restantes son como los definidos en la décimo sexta realización específica.

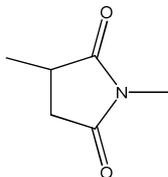
- 55 En una décimo séptima realización específica, L' en la décimo sexta realización específica se representa por la siguiente Fórmula:



en donde:

- 60 R_1^a , R_2^a , y R_3^b son cada uno independientemente $-H$ o un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono, preferentemente $-Me$;
- R_4^b es $-H$, un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono (preferentemente $-Me$), $-SO_3H$, o $-SO_3M^+$, en donde M^+ es un catión farmacéuticamente aceptable;
- 65 a es un número entero de 0-5 (*por ejemplo*, de 0 a 2, 3, 4, ó 5), y b es un número entero de 0-6 (*por ejemplo*, de 0 a 3, 4, 5, ó 6); y,

Cy es un anillo heterocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que porta un N heteroátomo, preferentemente Cy es



5 En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta o la décimo séptima realización específica, W' es -N(R^e)-.

En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta o la décimo séptima realización específica, R^e es -(CH₂-CH₂-O)₂₋₆-R^k, en donde R^k es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

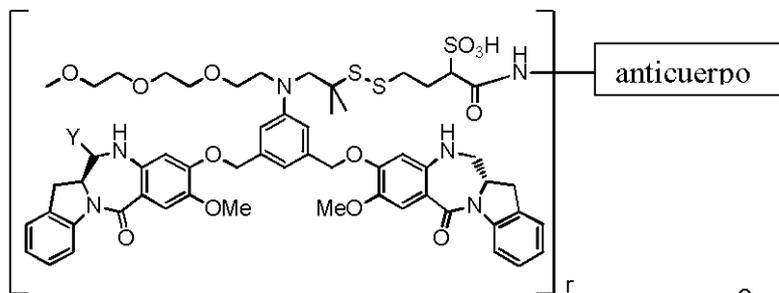
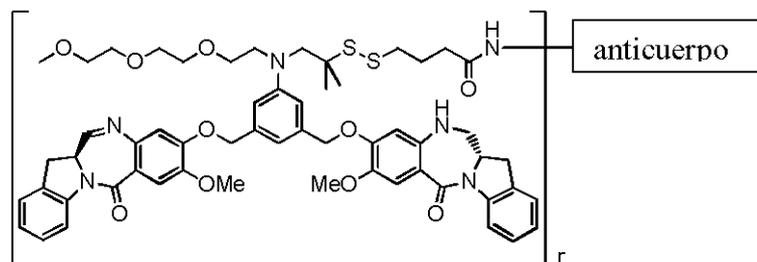
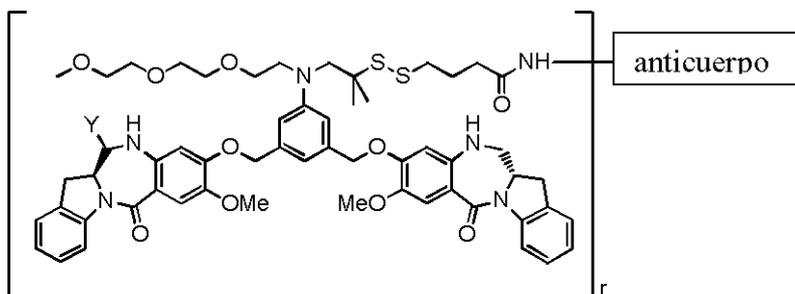
10 En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta o la décimo séptima realización específica, V es -S- o -SS-.

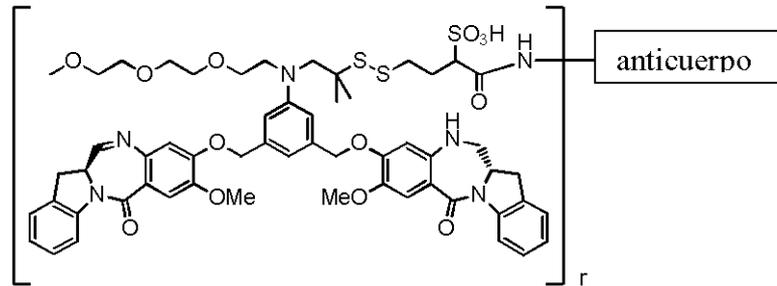
En una décimo octava realización específica, L' en la décimo sexta o la décimo séptima realización específica se representa por la siguiente Fórmula:



15

En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta a décimo octava realización específicas, el conjugado es:

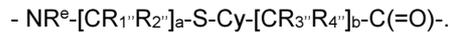




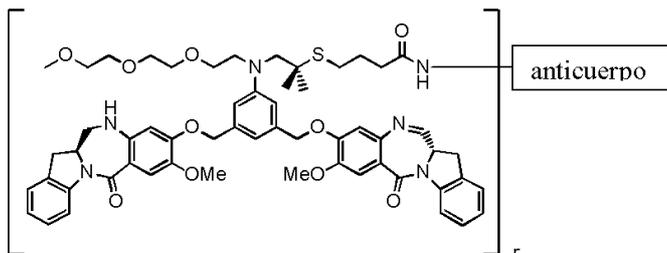
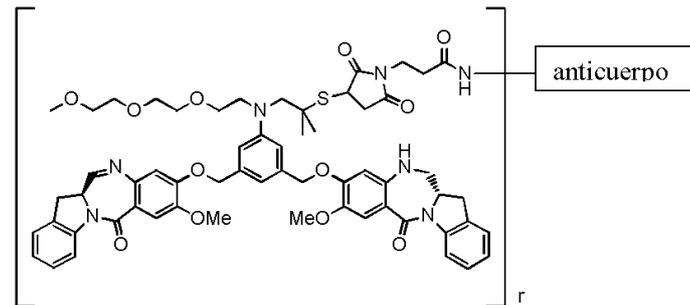
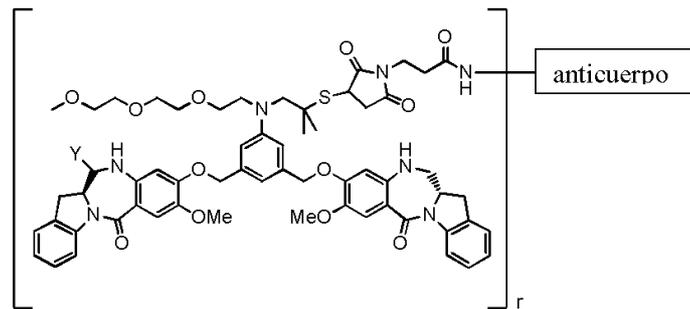
en donde r es un número entero de 1 a 10, Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

5 En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta a la décimo octava realizaciones específicas, el anticuerpo es huMy9-6,

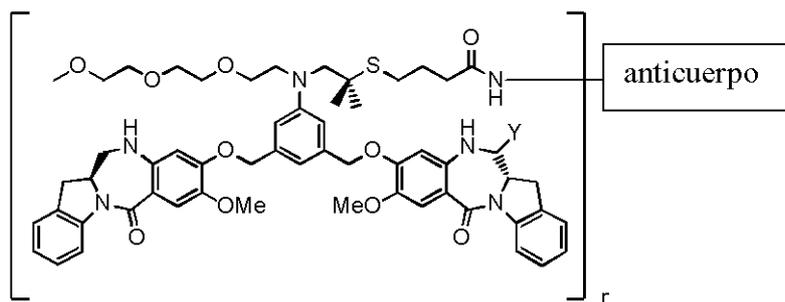
10 En una décimo novena realización específica, L' en la décimo sexta o la décimo séptima realización específica se representa por la siguiente Fórmula:



En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta, décimo séptima, y la décimo novena realizaciones específicas, el conjugado es:



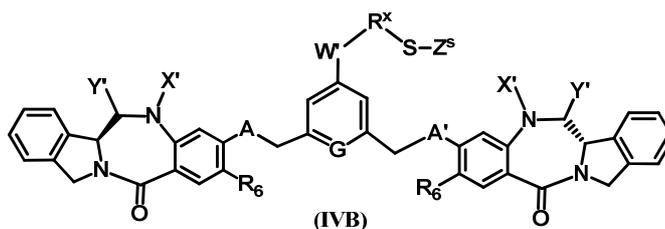
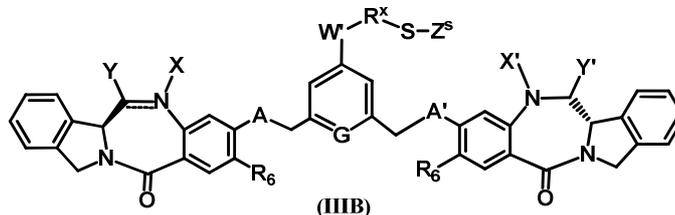
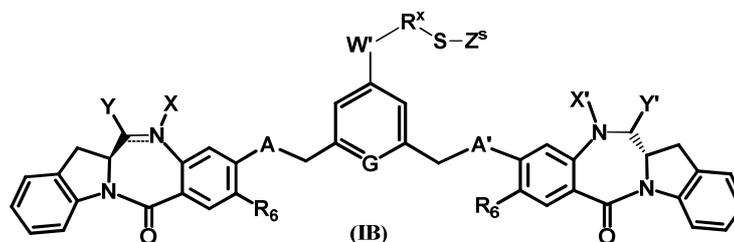
15



en donde r es un número entero de 1 a 10, Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

5 En ciertas realizaciones, tal como en la décimo sexta, décimo séptima, y la décimo novena realizaciones específicas, el anticuerpo es huMy9-6,

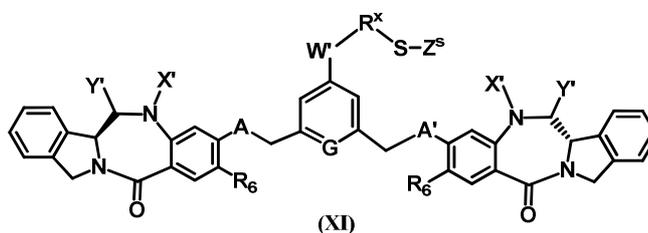
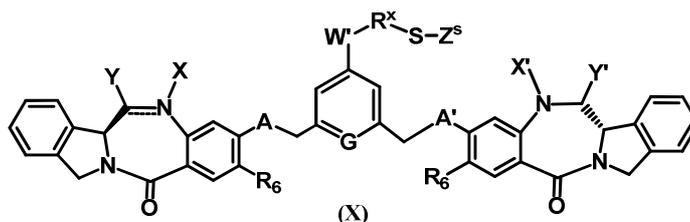
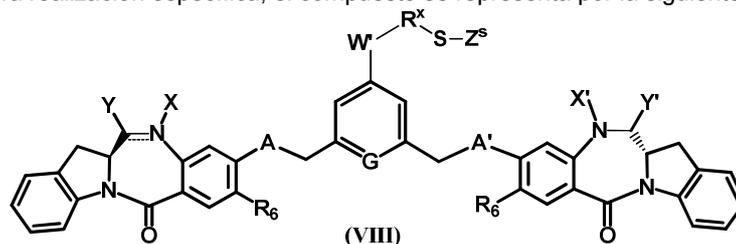
10 En una vigésima realización específica, el compuesto se representa por la siguiente fórmula:



en donde:

15 W^o está ausente, o se selecciona de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S-, -CH₂-S-, o -CH₂NR^e-;
R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
R^e es -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que
20 porta opcionalmente un amino secundario (por ejemplo, -NHR¹⁰¹) o un grupo amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
Z^s está unido al CBA, y es un enlace, o -SR^m-;
25 R^m es R^d o un alquilo lineal o ramificado sustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono que porta un éster reactivo, seleccionado de N-hidroxisuccinimida ésteres, N-hidroxifalimida ésteres, N-hidroxi sulfo-succinimida ésteres, para-nitrofenil ésteres, dinitrofenil ésteres, y pentafluorofenil ésteres;
R^d se selecciona de fenilo, nitrofenilo, dinitrofenilo, carboxinitrofenilo, piridilo o nitropiridilo; y
30 n es un número entero de 1 a 24; y el resto de las variables son como se describió anteriormente en la octava o décimo quinta realización específica.

En una vigésima primera realización específica, el compuesto se representa por la siguiente fórmula:



5

en donde:

W' está ausente, o se selecciona de $-O-$, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, $-S-$, $-CH_2-S-$, o $-CH_2NR^e-$;

R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

10 R^e es $-H$, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, en donde R^k es un $-H$, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un amino secundario (por ejemplo, $-NHR^{101}$) o un grupo amino terciario ($-NR^{101}R^{102}$) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R^{101} y R^{102} son

15

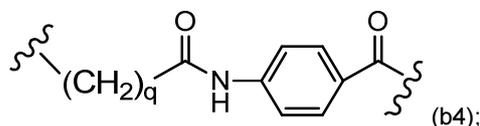
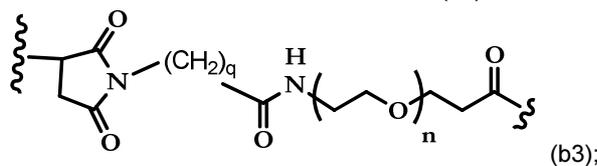
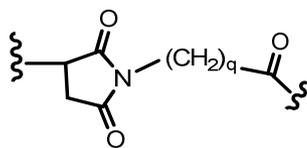
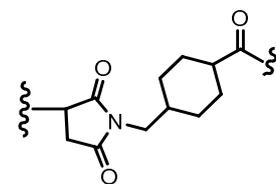
cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

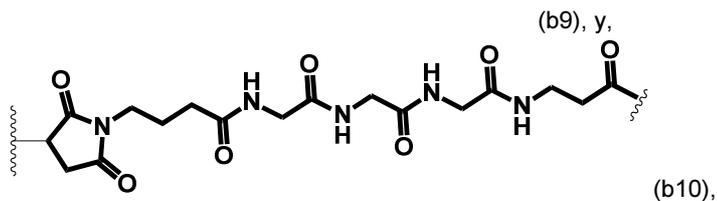
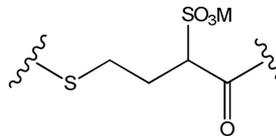
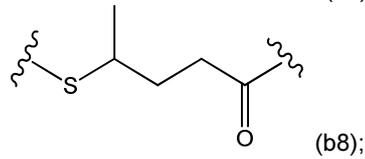
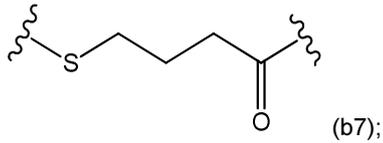
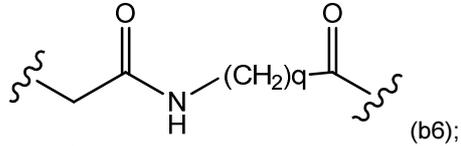
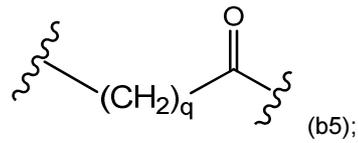
n es un número entero de 2 a 6;

Z^s está unido al CBA, y se selecciona de:

un enlace;

20

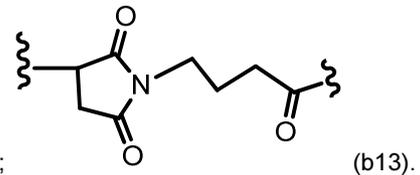
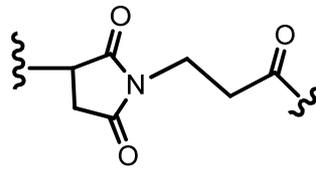
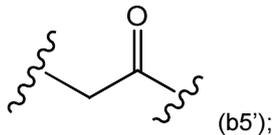
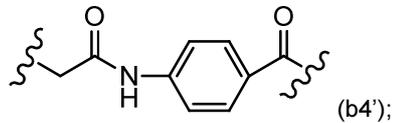
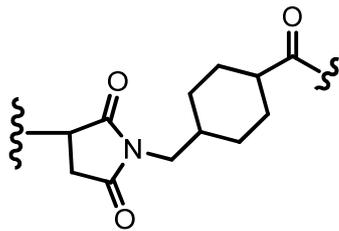




en donde:

q es un número entero de 1 a 5; y,
M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺.

En ciertas realizaciones, Z^s se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



En ciertas realizaciones, W' es -N(R^e)-.

En ciertas realizaciones, R^e es -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

En ciertas realizaciones, R^k es -H o -Me, n es 4, y q es 2,

En ciertas realizaciones, R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

En ciertas realizaciones, R^x es -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, en donde R^f y R^g se seleccionan cada uno independientemente de

H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y p es 0, 1, 2 ó 3,

En ciertas realizaciones, R^f y R^g son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H y -Me; y p es 1,

- 5 En una vigésimo segunda realización específica, el conjugado de la Fórmula (VIII), (X) y (XI) descrito en la vigésimo primera realización específica, las variables son como las descritas más abajo:

10 la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X sea -H; Y es -H, -OH o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -OH o -SO₃M);
 M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, Na⁺);
 X' e Y' son ambos -H;
 A y A' son ambos -O-;
 R₆ es -OMe; y
 15 R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

En una vigésimo tercera realización específica, para los compuestos de la Fórmula (IB), (IIIB) y (IVB) descritos en la vigésima realización específica, las variables son como las descritas más abajo:

20 la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X sea -H; Y es -H, -OH o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -OH o -SO₃M);
 M es -H o Na⁺;
 X' e Y' son ambos -H;
 25 A y A' son ambos -O-;
 R₆ es -OMe;
 R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

30 Preferentemente, R^x es -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, en donde R^f y R^g se seleccionan cada uno independientemente de -H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; p es 0, 1, 2 ó 3, Con mayor preferencia, R^f y R^g son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H y -Me; y p es 1,

35 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realizaciones específicas, la doble línea \equiv entre N y C puede representar un doble enlace.

40 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realizaciones específicas, la doble línea \equiv entre N y C puede representar un enlace simple, X es -H, el grupo de enlace, o un grupo protector amina (*por ejemplo*, X es -H); e Y es -H o seleccionado de -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituidos, -SO₃M, -SO₂M y un sulfato -OSO₃M. En ciertas realizaciones, Y no es -H.

45 En ciertas realizaciones, Y se selecciona de -H, -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH (*por ejemplo*, Y es -SO₃M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH).

En ciertas realizaciones, Y es -H, -SO₃M o -OH (*por ejemplo*, Y es -SO₃M o -OH).

En ciertas realizaciones, M es -H, Na⁺ o K⁺.

- 50 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realizaciones específicas, W, cuando está presente, es C=O.

55 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realización específicas, Z y Z', cuando están presentes, son -CH₂-.

60 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realización específicas, X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquénilo o alquínilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, el grupo de enlace, y un grupo protector amina.

En ciertas realizaciones, X' es -H, -OH, -Me o el grupo de enlace.

En ciertas realizaciones, X' es -H.

- 65 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realización específicas, Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo,

alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

En ciertas realizaciones, Y' es -H u oxo.

5 En ciertas realizaciones, Y' es -H.

En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realización específicas, A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -O-, -S-, -N(R₅)-, y oxo (C=O).

10

En ciertas realizaciones, A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -O- y -S-.

En ciertas realizaciones, A y A' son -O-.

15 En cualquiera de las realizaciones específicas para el conjugado de la invención anterior, tal como la décimo cuarta a la vigésimo tercera realización específicas, D y D', cuando están presentes, son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de una unidad de polietilenglicol (-OCH₂CH₂)_n, en donde n es un número entero de 1 a 24, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, o un alquilo, alqueno, o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, en donde el alquilo, alqueno y alquino son opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en halógeno, -OR, -NR'COR'', -SR y -COR'.

20

En ciertas realizaciones, D y D' son un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 4 átomos de carbono.

25 En una vigésimo cuarta realización específica, el conjugado de la presente invención como se describió en la décimo cuarta, décimo quinta, o la vigésimo primera realización específica se representa por lo siguiente:

la doble línea == entre N y C representa a doble enlace;

Y es -H;

30

W es C=O;

R₁, R₂, R₁', R₂', R₄ y R₄' son -H;

uno de R₃, o R₃' es opcionalmente el grupo de enlace y el otro es -H;

R₆ es -OMe;

Z y Z' son -CH₂;

35

X' es -H;

Y' es -H; y

A y A' son -O-.

40 En ciertas realizaciones, el conjugado de cualquiera de las realizaciones descritas, tal como la décimo cuarta a la vigésimo cuarta realizaciones específicas, puede comprender 1-10 compuestos citotóxicos, 2-9 compuestos citotóxicos, 3-8 compuestos citotóxicos, 4-7 compuestos citotóxicos, ó 5-6 compuestos citotóxicos, cada compuesto citotóxico comprende el grupo de enlace que une el compuesto citotóxico al CBA, y cada compuesto citotóxico en el conjugado es el mismo.

45 En cualquiera de las realizaciones de conjugados, tales como la décimo cuarta a la vigésimo cuarta realizaciones específicas, el agente de unión celular puede unirse a las células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B, o melanocitos; células que expresan el CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA, o antígenos Her-2; antígenos Her-3; o células que expresan el receptor del factor de crecimiento insulínico, receptor del factor de crecimiento epidérmico, y receptor de folato.

50

En cualquiera de las realizaciones de conjugados, tales como la décimo cuarta a la vigésimo cuarta realización específicas, el agente de unión celular puede ser un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla, o un to fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un dominio de anticuerpo, un fragmento de dominio de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, una linfoquina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias, o una molécula de transporte de nutrientes.

55

60

El anticuerpo puede ser un anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena sencilla revestida, o un fragmento de anticuerpo revestido.

65 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla, o un fragmento de este anticuerpo monoclonal.

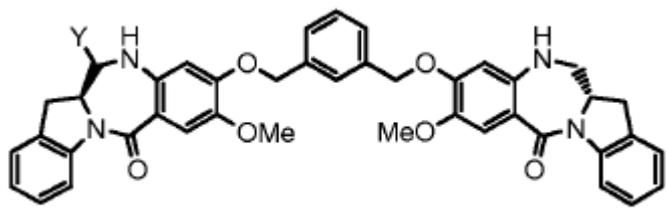
El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado.

5 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados descritos en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además un compuesto fármaco-enlazador que comprende cualquiera de los compuestos sujetos de la invención enlazados covalentemente a un enlazador bifuncional.

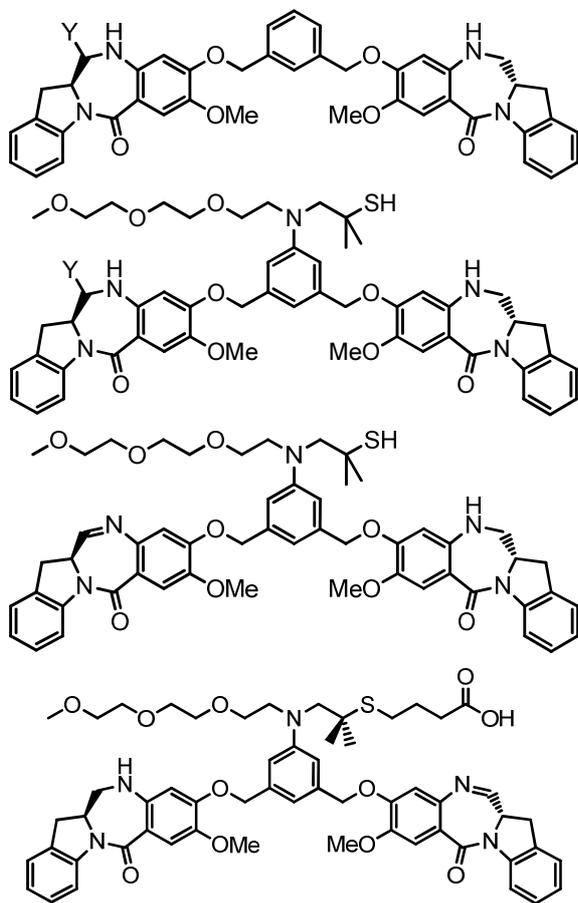
10 La invención proporciona adicionalmente un conjugado que comprende cualquiera de los compuestos objeto, o los compuestos fármaco-enlazador objeto, enlazados a un agente de unión celular.

15 La invención proporciona además un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11-22, o un compuesto representado por la fórmula siguiente:

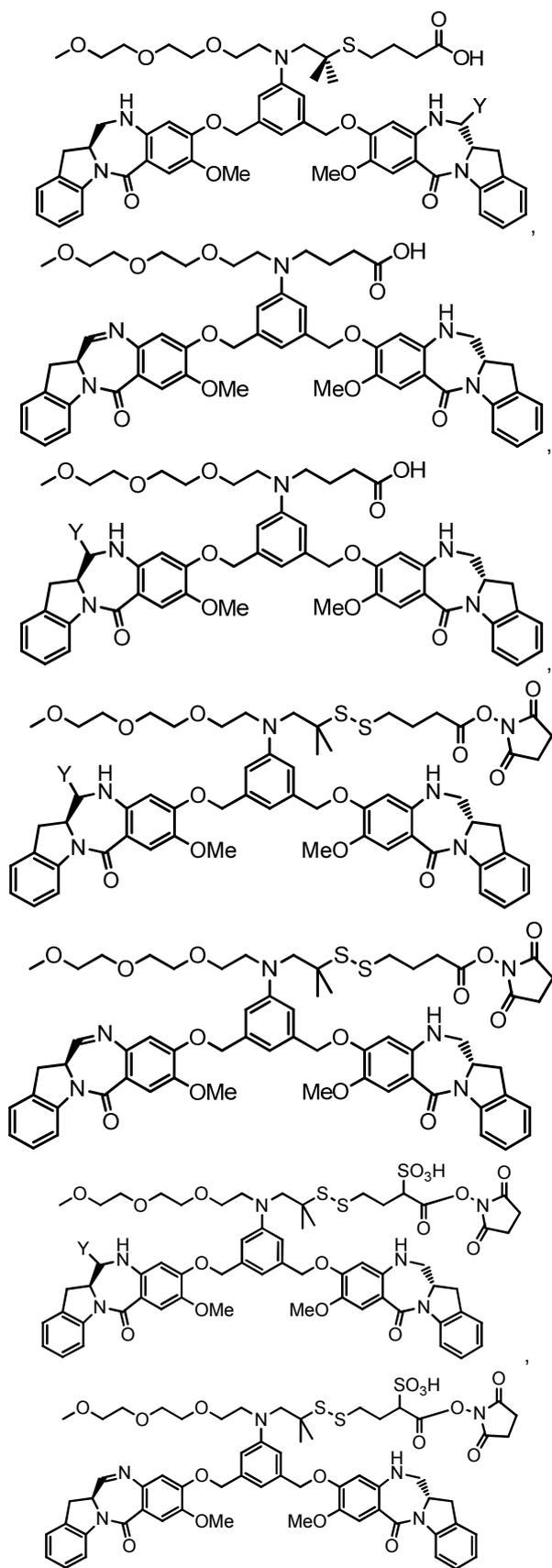


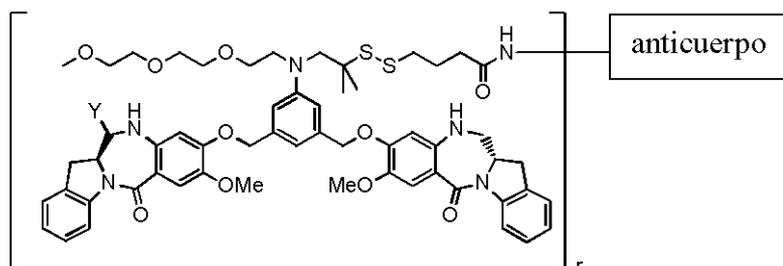
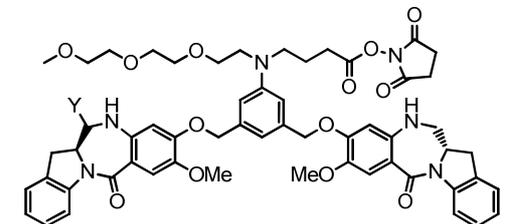
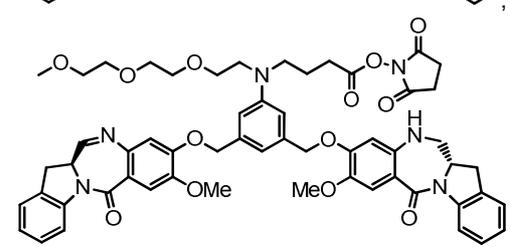
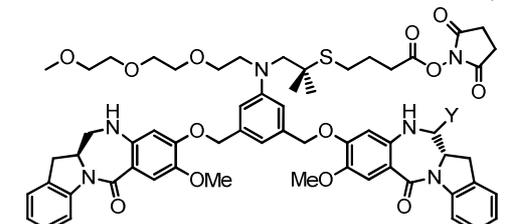
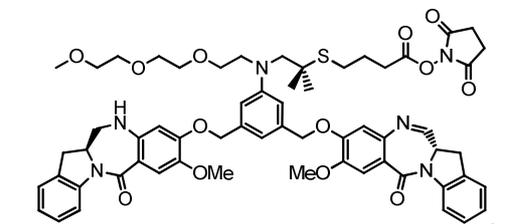
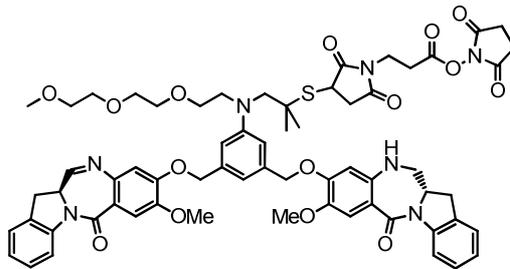
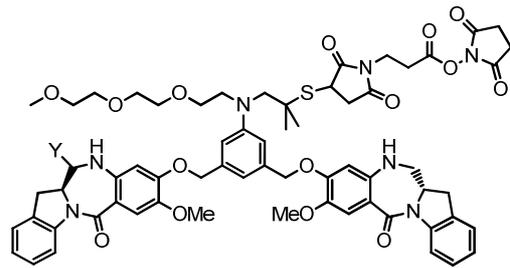
20 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H, o un catión farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en un método para inhibir el crecimiento anormal de la célula o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmune, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastornos neurodegenerativos, pancreatitis o enfermedad renal riñón en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos (con o sin cualquier grupo enlazador) o conjugados de la invención, y, opcionalmente, un segundo agente quimioterapéutico.

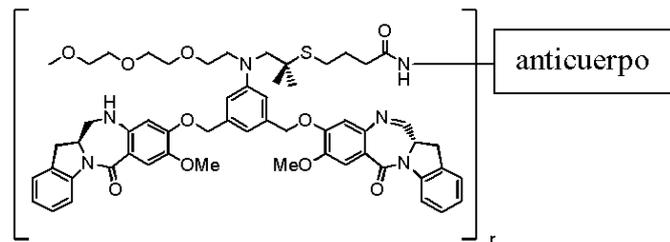
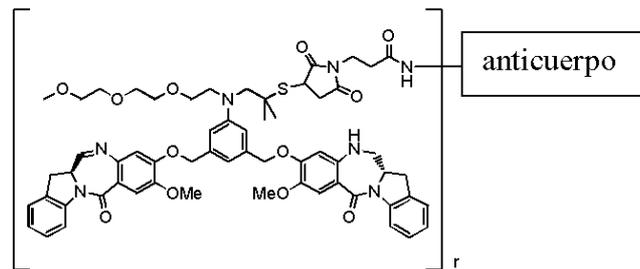
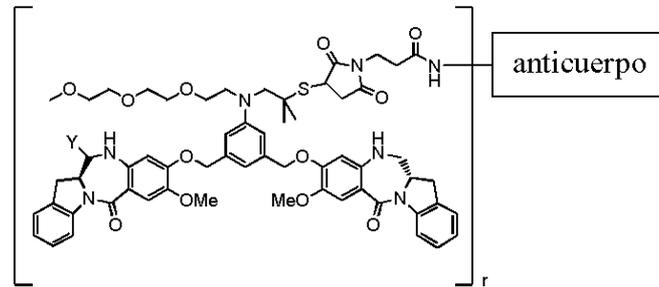
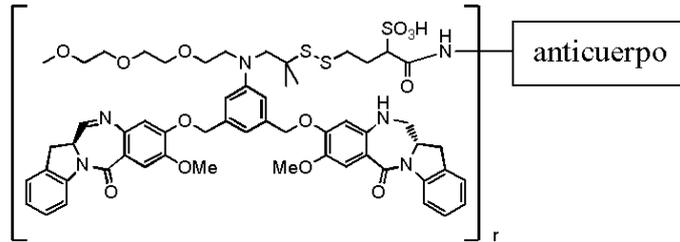
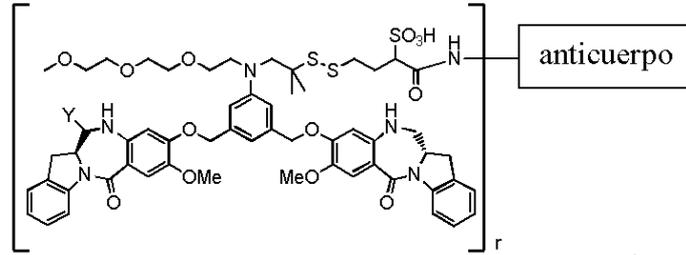
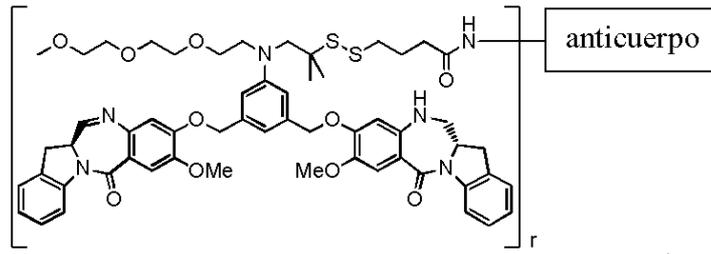
25 En ciertas realizaciones, el compuesto o el conjugado es:

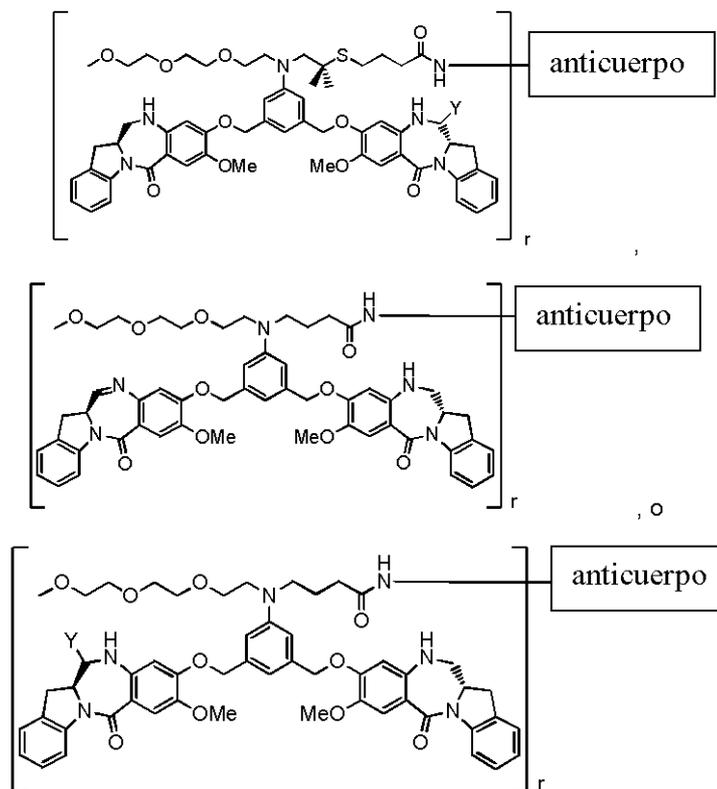


30









en donde r es un número entero de 1 a 10, Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

- 5 En ciertas realizaciones, el segundo agente quimioterapéutico es para administración a un mamífero secuencialmente o consecutivamente.

En ciertas realizaciones, el método es para tratar una condición seleccionada de cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, y deficiencia inmune.

En ciertas realizaciones, el método o conjugado es para tratar un cáncer.

En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona a partir del cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de cuello y cabeza, melanoma, cáncer colorectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, cáncer testicular, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cánceres de órganos linfáticos y malignidad hematológica incluyendo leucemia (leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena Aguda (AML), Leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica Aguda (AMOL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular de células grandes, leucemia de células T adultas), linfoma (linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfomas de Hodgkin (esclerosis nodular, celularidad mixta, rica en linfocitos, linfocitos agotados o no agotados, y linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos), linfomas no-Hodgkin (todos los subtipos), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmático (tales como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, neoplasma de células plasmáticas (mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulina monoclonal, enfermedades de cadena pesada), linfoma extranodal de células B marginales (linfoma de MALT), linfoma nodal zona marginal de células B (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastinal (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt/Leucemia, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma extranodal de células T/NK (tipo nasal), linfoma de células T tipo enteropático, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoides / síndrome de Sézary, trastornos primarios cutáneos linfoproliferativos de células T positivas a CD30, linfoma primario cutáneo de células grandes anaplásticas, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunooblástico de células T, linfoma periférico de células T (inespecífico), linfoma de células grandes anaplásticas), mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler).

PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS FÁRMACO-AGENTE DE UNIÓN CELULAR

Para enlazar los compuestos citotóxicos o derivados de estos de la presente invención con el agente de unión celular, el compuesto citotóxico puede comprender una porción enlazadora con un grupo reactivo unido a éste. En una realización, un reactivo de entrecruzamiento bifuncional puede reaccionar primero con el compuesto citotóxico para proporcionar el compuesto que porta una porción enlazadora con un grupo reactivo unido a éste (*es decir*, compuesto fármaco-enlazador), que puede reaccionar después con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del reactivo de entrecruzamiento bifuncional pueden reaccionar primero con el agente de unión celular para proporcionar el agente de unión celular que porta una porción enlazadora con un grupo reactivo unido a éste, que puede después reaccionar con un compuesto citotóxico. La porción enlazadora puede contener un enlace químico que permite la liberación de la porción citotóxica en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles de ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles de peptidasa y enlaces lábiles de ésterasa (ver por ejemplo, las Patentes US 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 y 7,414,073). Los preferidos son los enlaces disulfuro, tioéter y enlaces lábiles de peptidasa. Otros enlazadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, tales como los descritos en detalle en la publicación U.S. número 2005/0169933, o enlazadores cargados o enlazadores hidrófilos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976,

Los compuestos de la Fórmula (I), (II) y (IV), (IA), (IIA) y (IVA), y (IB), (IIB) y (IVB) pueden unirse a través de R₁, R₂, R₃, R₄, R₁' , R₂' , R₃' , R₄' , L' , L'' , L''' , o X (cuando esté presente). De éstos, los grupos de enlace preferidos son R₂' , R₃' , R₄' , L' , L'' , L''' y los grupos de enlace más preferidos son R₂' , R₃' , y L' . Los ejemplos de grupos de enlaces para los compuestos de la fórmula (I), (II) y (IV), (IA), (IIA) y (IVA), y (IB), (IIB) y (IVB) se describen anteriormente.

En una realización, una solución de un anticuerpo en el tampón acuoso puede incubarse con un exceso molar de un agente modificador de anticuerpo tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o con *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) para introducir los grupos ditiopiridilos. El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con el compuesto citotóxico que contiene tiol, tal como el compuesto **2a**, para producir un conjugado dímero de indolinobenzodiazepina-anticuerpo enlazado a disulfuro. El conjugado de agente de unión celular-fármaco se puede purificar después usando cualquiera de los métodos de purificación conocidos en la técnica, tal como aquellos descritos en la Patente US No. 7,811,572 y la Publicación US No. 2006/0182750. Por ejemplo, el conjugado de agente de unión celular-fármaco se puede purificar usando la filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración adsorbente, precipitación selectiva, filtración no absorbente o combinación de éstos. Preferentemente, filtración en flujo tangencial (TFF, además conocida como filtración de flujo cruzado, ultrafiltración y diafiltración) y/o resinas para cromatografía de adsorción se usan para la purificación de los conjugados.

Alternativamente, el anticuerpo se puede incubar con un exceso molar de un agente modificador de anticuerpos, tales como 2-iminotiolano, L-homocisteína tiolactona (o derivados), o *N*-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) para introducir grupos sulfhidrilo. El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con el agente citotóxico adecuado que contiene disulfuro, para producir un conjugado de agente citotóxico-anticuerpo enlazado a disulfuro. El conjugado de anticuerpo-agente citotóxico se puede purificar después por los métodos descritos anteriormente. La unión celular se puede además modificar por ingeniería genética para introducir porciones tiol, tales como anticuerpos modificados por ingeniería genética con cisteína descritos en las Patentes US Nos. 7,772,485 y 7,855,275,

En otra realización, una solución de un anticuerpo en el tampón acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente modificador de anticuerpo tal como *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato para introducir grupos maleimidias, o con *N*-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilos. El anticuerpo modificado se hace reaccionar después con el agente citotóxico que contiene tiol para producir un conjugado de citotóxico-anticuerpo enlazado con tioéter. El conjugado de anticuerpo-citotóxico se puede purificar después por los métodos descritos anteriormente.

El número de moléculas citotóxicas unidas por molécula de anticuerpo puede determinarse espectrofotométricamente midiendo la relación de la absorbancia a 280 nm y 330 nm. Un promedio de 1-10 compuestos citotóxicos/molécula(s) de anticuerpo(s) se pueden enlazar mediante los métodos descritos en la presente. El número promedio preferido de compuestos citotóxicos enlazados por molécula de anticuerpo es 2-5, y la máxima preferencia es 2,5-4,0,

Los agentes citotóxicos que contienen enlazadores que terminan en un éster de *N*-hidroxi succinimidilo (NHS), tales como los compuestos **1g** y **10**, pueden reaccionar con el anticuerpo para producir conjugados directamente enlazados por amidas tales como huMy9-6-SPDB-**1f** o huMy9-6-BMPS-**1f**. El conjugado de anticuerpo-agente citotóxico se puede purificar después por filtración en gel por cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Los procesos representativos para la preparación de los conjugados de fármaco-agente de unión celular de la presente invención se muestran en las FIGS. 22 y 23. Un compuesto dímero citotóxico de la presente invención

5 puede conjugarse con un agente de unión celular ya sea a través de un métodos de conjugación en una etapa o en dos etapas. En las FIGs. 22a y 22b, se describen ejemplos representativos, en donde un compuesto dímero que posee un enlazador tal como un éster de N-hidroxisuccinimida se hace reaccionar directamente con un agente de unión celular, tal como un anticuerpo, generando el conjugado deseado. En la FIG. 22c el dímero enlazador **1g** se trató primero con bisulfato sódico para proporcionar un compuesto dímero modificado **26** antes de añadir el anticuerpo para formar el conjugado huMy9-6-SBDP-**1f** de la presente invención.

10 Un ejemplo representativo de un método de conjugación de dos etapas se describe en la FIG. 23, en donde un anticuerpo se modifica primero con un agente de entrecruzamiento bifuncional resultando en un anticuerpo que posee un número deseado de enlazadores adecuados para la reacción con un compuesto dímero que tiene una posición tiol libre. En este ejemplo el anticuerpo huMy9-6 se modificó primero con SPDB para dar un anticuerpo con enlazadores que contienen la porción ditiopiridil. El anticuerpo modificado se expuso después a un tiol libre, tal como **2a**, generando el conjugado deseado huMy9-6-SPDB-**2a**.

15 Los procesos para sintetizar los compuestos fármaco-enlazador y conjugados de la invención se describen además en la solicitud de patente provisional U.S. No. 61/443,092, presentada el 15 de febrero de 2011, y una solicitud de utilidad U.S. que reivindica el beneficio de la fecha de presentación de ésta y presentada el mismo día de la solicitud actual, titulada "METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES".

20 Las estructuras de los compuestos y conjugados representativos de la presente invención se muestran en las Tablas 1-8. Estos compuestos y conjugados se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Tabla 1. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención.

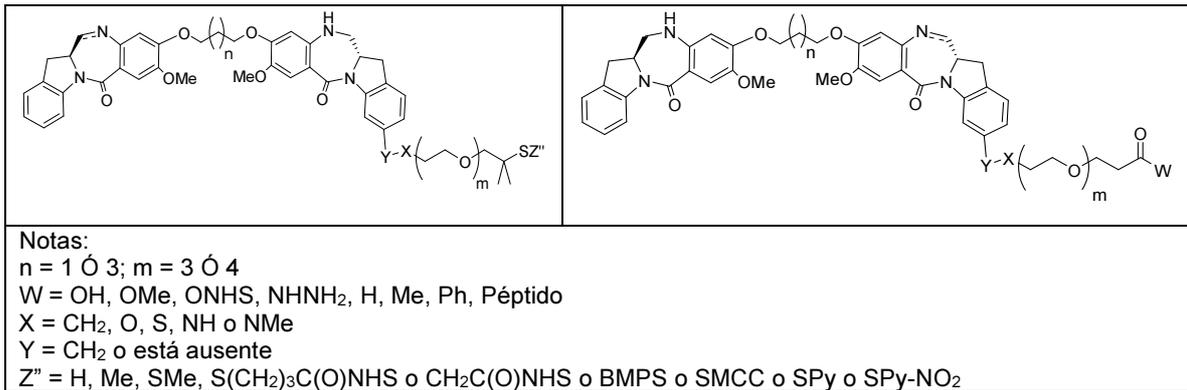


Tabla 2. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención (continuación).

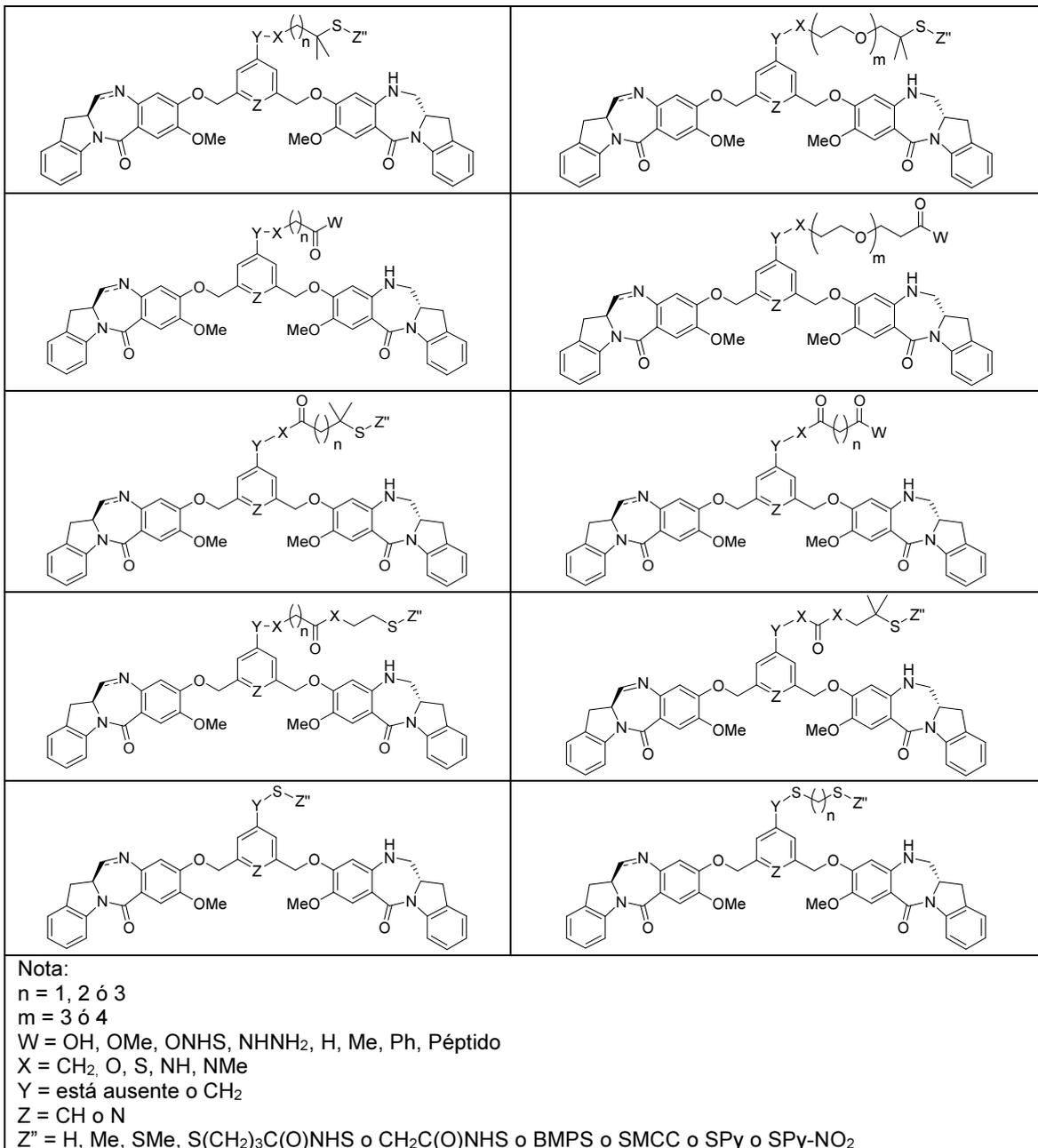


Tabla 3. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención (continuación).

<p>Nota: n = 1, 2 ó 3 m = 3 ó 4 W = OH, OMe, ONHS, NHNH₂, H, Me, Ph, Péptido X = CH₂, O, S, NH, NMe Z = CH ó N Z'' = H, Me, SMe, S(CH₂)₃C(O)NHS ó CH₂C(O)NHS ó BMPS ó SMCC ó SPy ó SPy-NO₂</p>	

Tabla 4. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención (continuación).

--	--

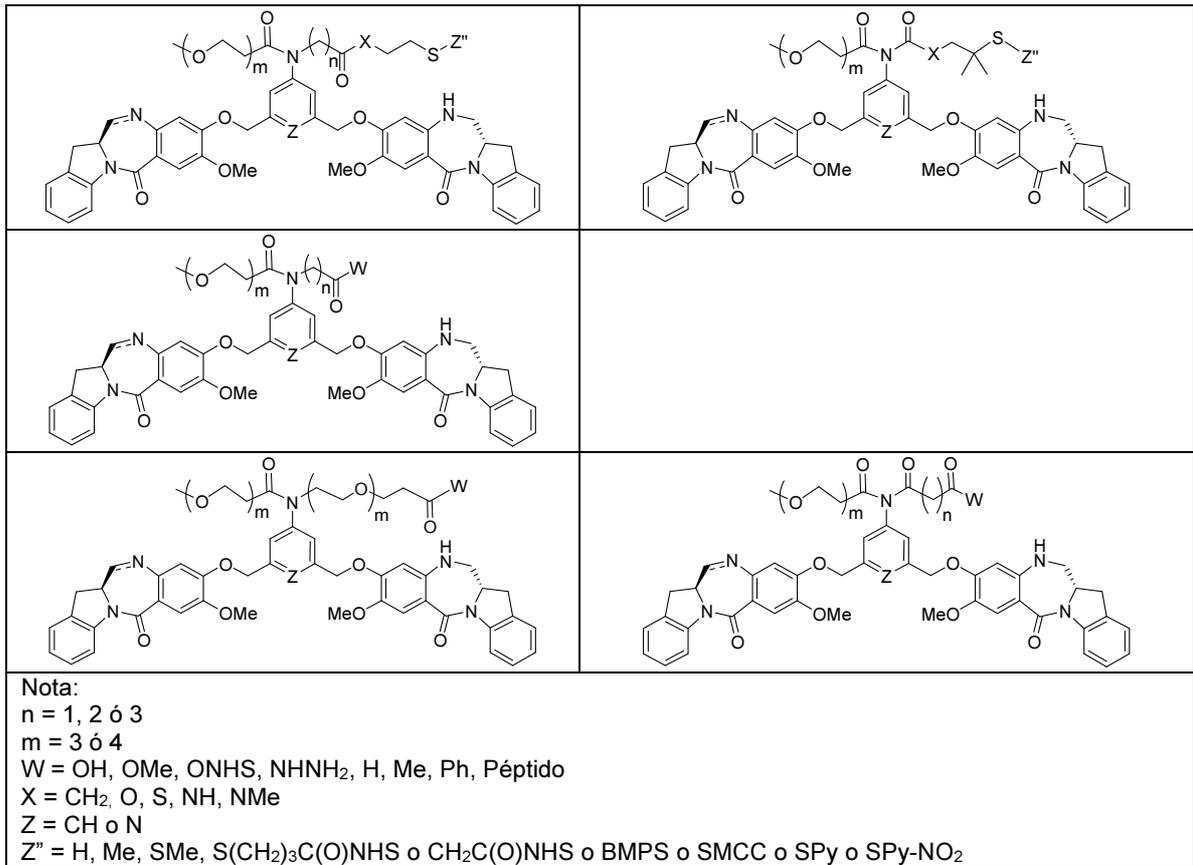
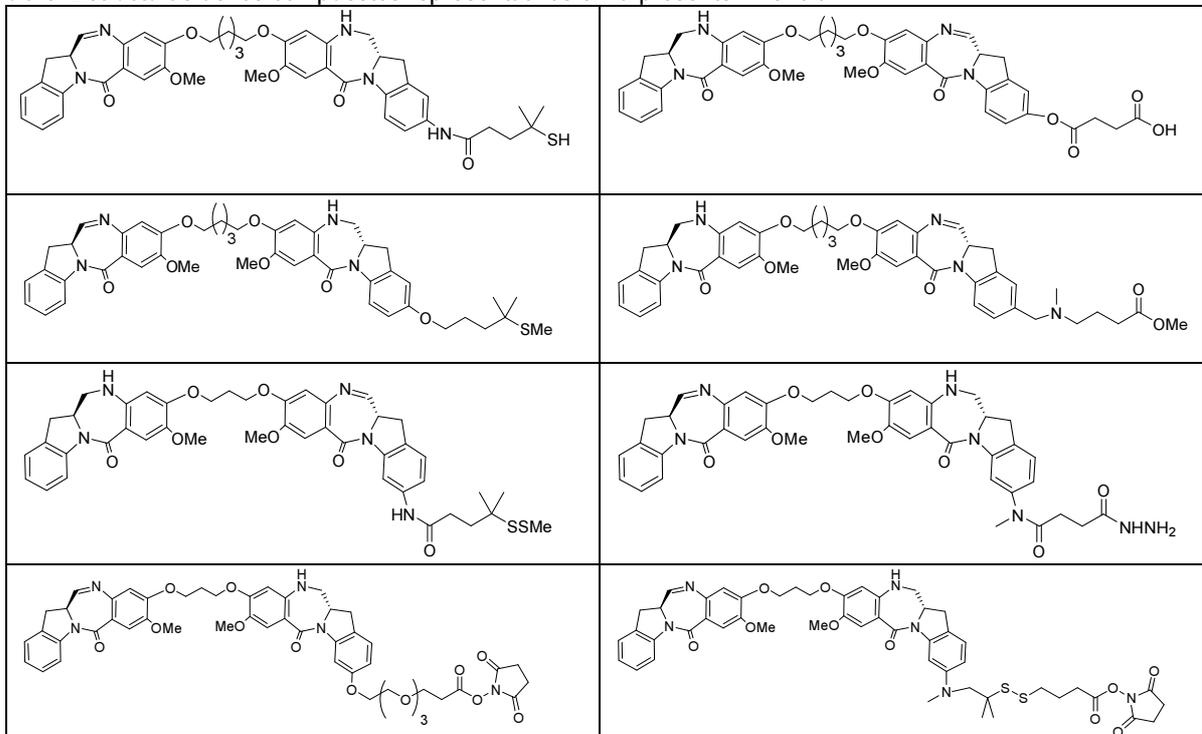


Tabla 5. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención.



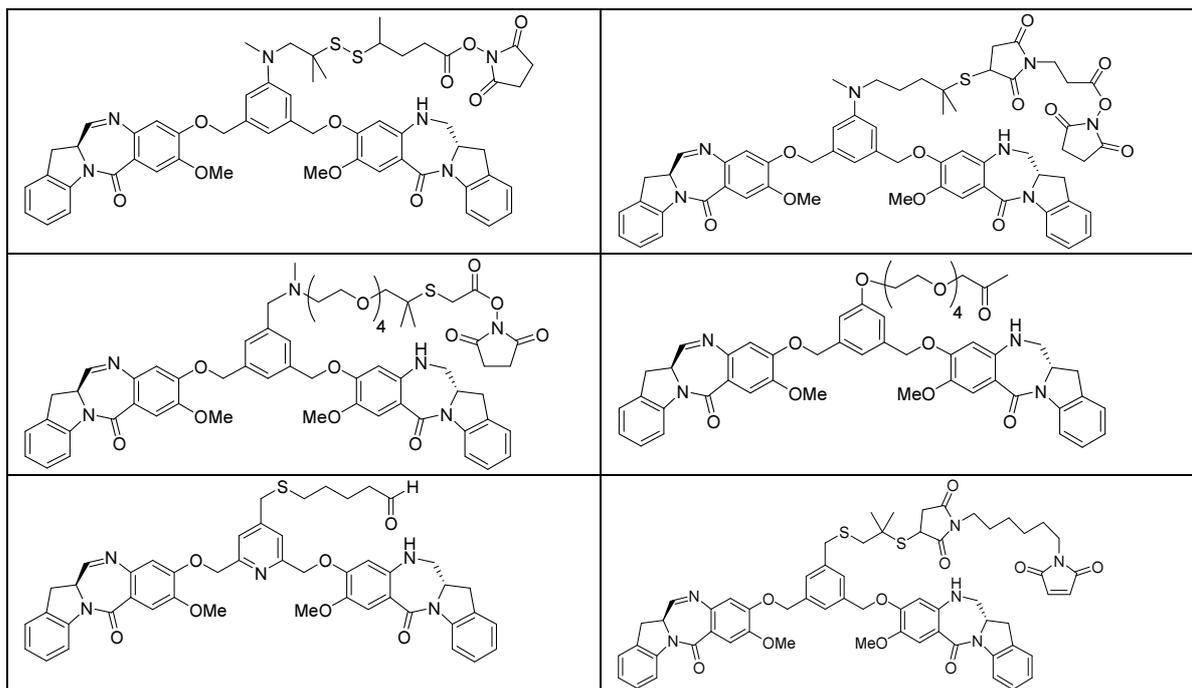
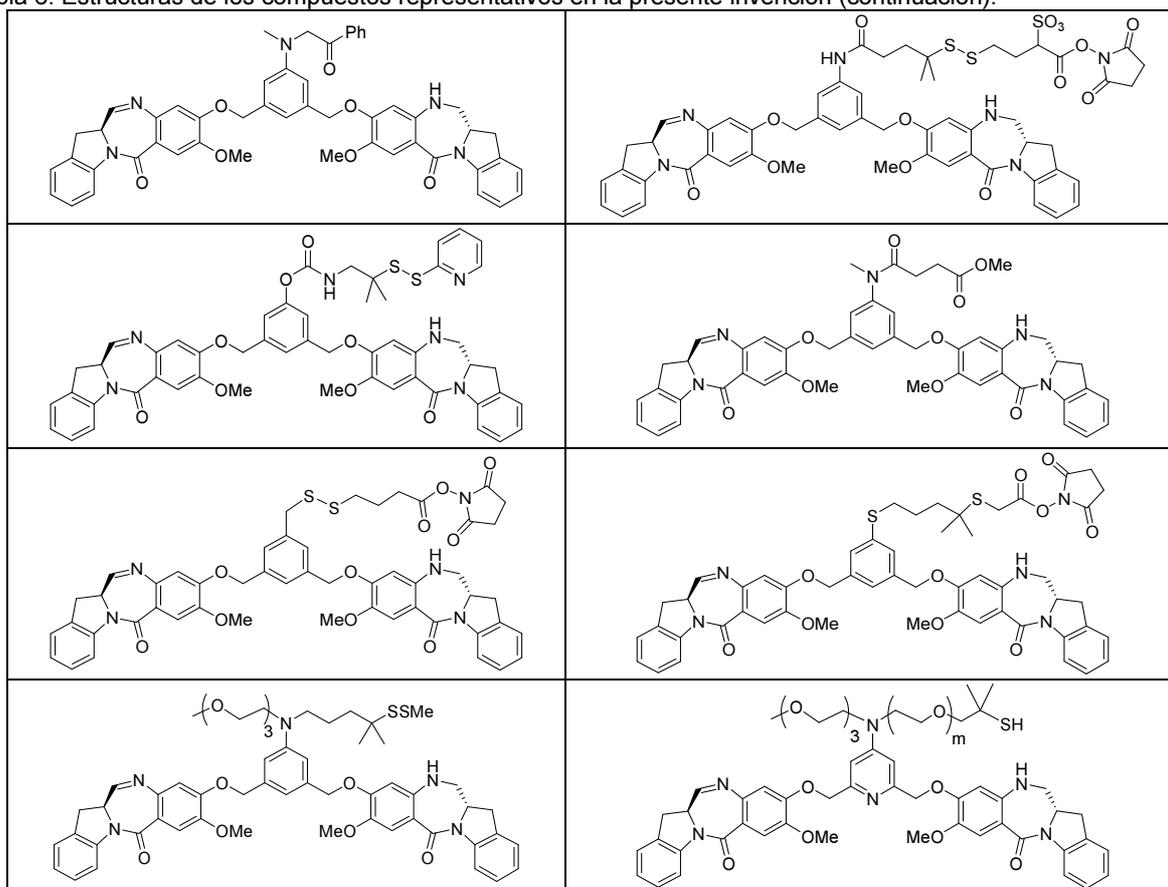


Tabla 6. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención (continuación).



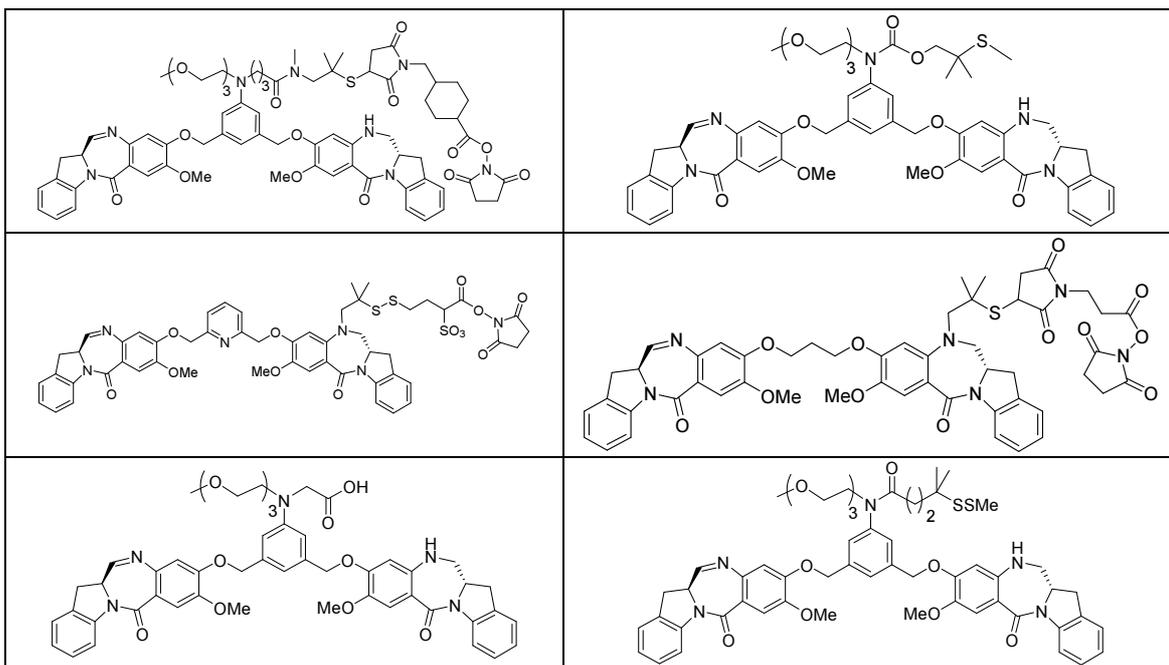


Tabla 7. Estructuras de los compuestos representativos en la presente invención (continuación).

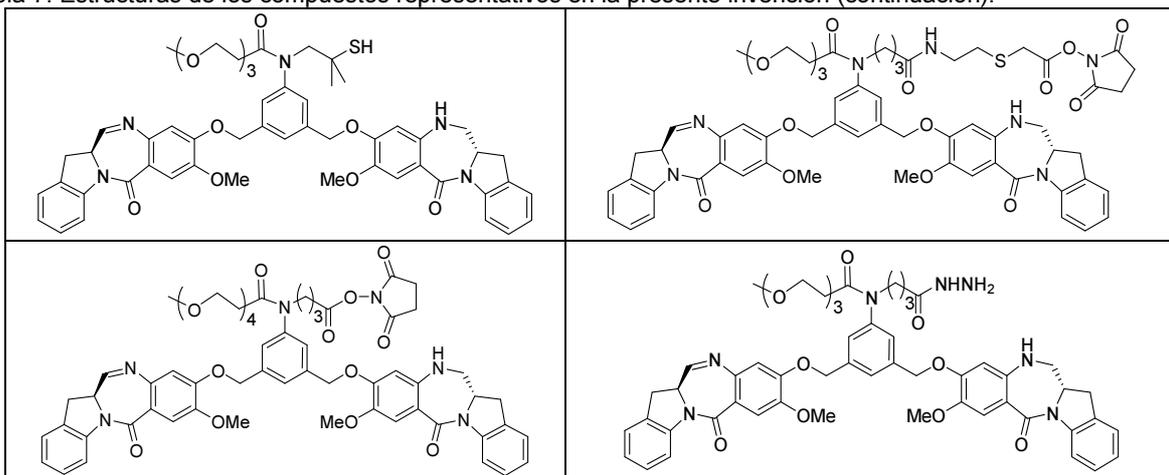
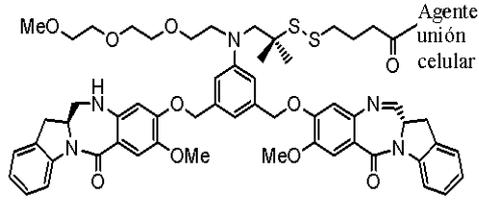
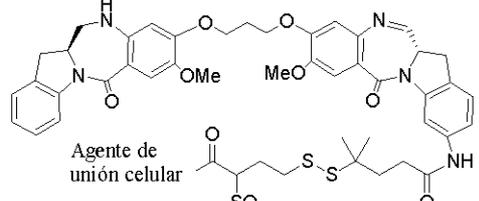
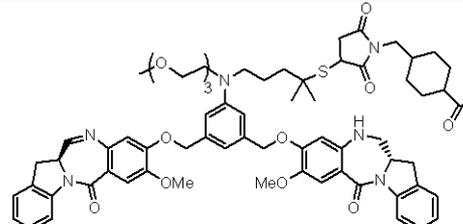
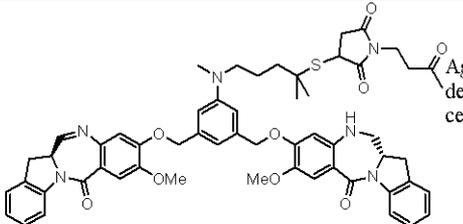
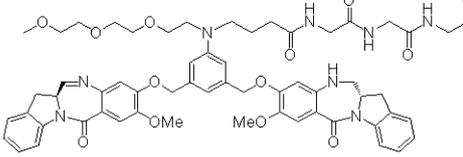
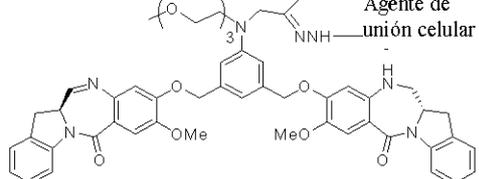
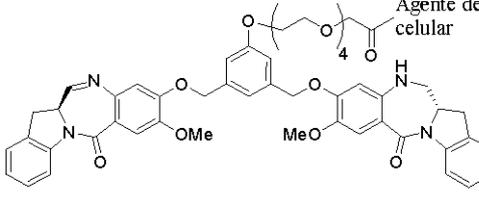
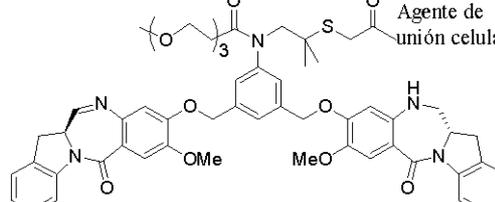
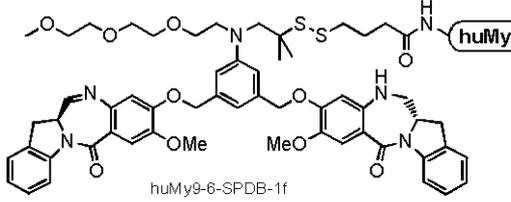
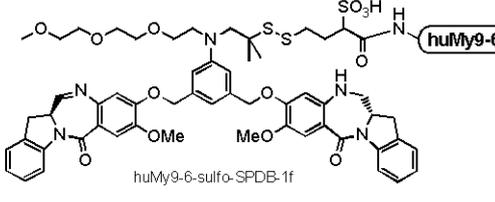
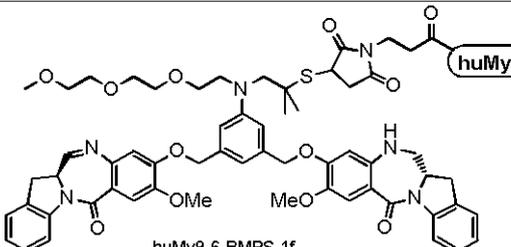


Tabla 8. Estructuras de los conjugados representativos de la presente invención.

 <p>Agente de unión celular</p>	 <p>Agente de unión celular</p>
 <p>Agente de unión celular</p>	 <p>Agente de unión celular</p>
 <p>Agente de unión celular</p>	 <p>Agente de unión celular</p>
 <p>Agente de unión celular</p>	 <p>Agente de unión celular</p>
 <p>huMy9-6-SPDB-1f</p>	 <p>huMy9-6-sulfo-SPDB-1f</p>
 <p>huMy9-6-BMPS-1f</p>	

CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS Y CONJUGADOS

5 Los compuestos citotóxicos y los conjugados de agente de unión celular-fármaco de la invención pueden evaluarse por su capacidad para suprimir la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea de carcinoma de colon humano COLO 205, la línea celular de rhabdomyosarcoma RH-30, y la línea celular de mieloma múltiple MOLP-8 pueden usarse para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos y conjugados. Las células a evaluar se pueden exponer a los compuestos o conjugados durante 1-5

10 días y las fracciones supervivientes de células se miden en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de CI_{50} pueden calcularse después a partir de los resultados de los ensayos. Alternativamente o adicionalmente, un

cribado de la sensibilidad de la línea celular *in vitro* tal como uno descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (ver Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239) puede usarse como una de las guías para determinar los tipos de cánceres que pueden ser sensibles al tratamiento con los compuestos o conjugados de la invención.

5 Los ejemplos de potencia y especificidad de la diana *in vitro* de los conjugados anticuerpo-agente citotóxico de la presente invención se muestran en las FIGs. 25-26, Todos los conjugados son extremadamente citotóxicos en las células de cáncer positivas al antígeno con una CI_{50} en el intervalo picomolar bajo. Las líneas celulares negativas al antígeno permanecieron viables cuando se expusieron a los mismos conjugados. Los dímeros de indolinobenzodiazepina mostraron potencia específica de la diana siendo 160 veces menos potentes cuando se bloqueó con anticuerpo huMy9-6 sin conjugar (anti-CD33) y 40 menos potentes cuando se bloqueó con el anticuerpo FOLR1 sin conjugar (anticuerpo anti-receptor de folato). Por ejemplo, el conjugado huMy9-6-SPDB-1f mató las células HL60/QC positivas al antígeno con un valor CI_{50} de 10,5 pM, mientras que la adición de un exceso de anticuerpo huMy9-6 sin conjugar redujo este efecto citotóxico ($CI_{50} = 1,69$ nM), demostrando la especificidad del antígeno (FIG. 25A). Adicionalmente, el conjugado huMy9-6-SPDB-1f es además altamente potente tanto hacia la línea celular HL60/ATCC con un valor CI_{50} de 21 pM como a la línea celular NB-4 con un valor CI_{50} de 190 pM (FIGS. 25B y 25C).

20 De manera similar, el conjugado huFOLR1-SPDB -1f fue altamente potente, con un valor CI_{50} de 55 pM para las células KB positivas al antígeno (FIG. 26). La adición de un exceso de anticuerpo huFOLR1 sin conjugar redujo este efecto citotóxico >40 veces, demostrando especificidad de antígeno.

25 El efecto de la conjugación en la unión del anticuerpo se midió comparando tanto la unión del anticuerpo huMy9-6 sin conjugar como el conjugado huMy9-6-SPDB-1f hacia la línea celular HL60/QC (FIG. 27). El análisis FACS reveló que no existe cambio en la capacidad de unión del conjugado con el anticuerpo desnudo indicando que no existe compromiso en la unión debido a la conjugación del agente citotóxico al anticuerpo.

30 En un ejemplo, se midió la eficacia *in vivo* de un conjugado agente de unión celular/agente citotóxico. Ratones desnudos que portan tumores HL60/QC humanos se trataron con el conjugado huMy9-6-SPDB-1f y se observó una regresión significativa del tumor en dosis múltiples mientras que en los ratones sin tratar los tumores crecieron rápidamente (FIG. 28). Se observó actividad a dosis tan bajas como 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ que es al menos 35 veces inferior que la dosis máxima tolerada.

35 El efecto de la saturación de imina hacia la tolerabilidad se muestra en la Tabla 9. Di-imina huFOLR1-fármaco 1 se probó en dosis múltiples y se encontró que todas son altamente tóxicas quedando solamente supervivientes en el grupo de ensayo más bajo probado a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por el contrario, se encontró que los conjugados mono-imina huFOLR1-Fármaco 2 y huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) parcialmente reducidos tienen una tolerancia significativamente mejorada con el conjugado huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) que muestra 100% de supervivencia animal a las dosis más altas probadas de 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

40 COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO

45 La presente invención incluye una composición (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) que comprende nuevos compuestos de benzodiazepina descritos en la presente (*por ejemplo*, indolinobenzodiazepina u oxazolidinobenzodiazepina), derivados de éstos, o conjugados de éstos, (*y/o* solvatos, hidratos *y/o* sales de éstos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable). La presente invención incluye además una composición (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) que comprende nuevos compuestos de benzodiazepina descritos en la presente, derivados de éstos, o conjugados de éstos, (*y/o* solvatos, hidratos *y/o* sales de éstos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable), que comprende además un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (*por ejemplo*, ser humano). Las presentes composiciones son útiles además para tratar la depresión, ansiedad, estrés, fobias, pánico, disforia, trastornos psiquiátricos, dolor y enfermedades inflamatorias en un mamífero (*por ejemplo*, ser humano).

55 La presente invención permite un método para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (*por ejemplo*, ser humano) que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de los nuevos compuestos de benzodiazepina descritos en la presente (*por ejemplo*, indolinobenzodiazepina u oxazolidinobenzodiazepina), derivados de éstos, o conjugados de éstos, (*y/o* solvatos y sales de éstos) o una composición de éstos, solo o en combinación con un segundo agente terapéutico.

60 La presente invención permite además métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados descritos anteriormente.

65 En la presente también se describe un método para inducir la muerte celular en las poblaciones de células seleccionadas que comprende contactar células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad eficaz de un agente citotóxico que comprende cualquiera de los agentes de unión celular-compuesto citotóxico (*por ejemplo*,

dímero indolinobenzodiazepina u oxazolindobenzodiazepina unido a un agente de unión celular) de la presente invención, una sal o solvato de éstos. Las células diana son células a las que se puede unir el agente de unión celular.

5 Si se desea, otros agentes activos, tales como otros agentes anti-tumorales, se pueden administrar junto con el conjugado.

Los portadores diluyentes y excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables, son bien conocidos y pueden determinarse por personas de habilidad ordinaria en la técnica según justifique la situación clínica.

10 Los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) disolución salina al 0,9% (0,9 % p/v de NaCl), y (3) 5% (p/v) de dextrosa; y puede contener además un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween 20,

15 El método para inducir la muerte celular en las poblaciones de células seleccionadas puede practicarse *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

20 Los usos *in vitro* incluyen tratamientos de trasplante autólogo de médula ósea antes de su trasplante en el mismo paciente para matar las células enfermas o malignas:

25 tratamientos de la médula ósea antes de su trasplante para eliminar las células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares para matar a todas las células, excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana, o para matar las variantes deseadas que expresan el antígeno no deseado.

Las condiciones de uso *in vitro* no-clínico se determinan fácilmente por un experto en la técnica.

30 Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son para eliminar las células tumorales o células linfoides a partir de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de la enfermedad autoinmune, o para eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea o tejidos autólogos o alogénicos antes del trasplante para prevenir la GVHD. El tratamiento se puede llevar a cabo como sigue. La médula ósea se recoge del paciente u otro individuo y se incuba después en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, las concentraciones oscilan de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a

35 aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, *es decir*, la dosis, se determinan fácilmente por el experto en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por vía intravenosa de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias donde el paciente recibe otro tratamiento tales como un ciclo de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el tiempo de la recogida de la médula y la reinfusión de

40 las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico estándar.

45 Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se suministra como una solución o un polvo liofilizado que se prueban para esterilidad y para niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración del conjugado son como sigue. Los conjugados se proporcionan semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis en bolo se proporcionan en 50 a 1,000 ml de disolución salina normal a la que se pueden añadir de 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosis serán 10 μ g a 2,000 mg por administración, por vía intravenosa (intervalo de 100 ng a 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento en una base semanal. Los protocolos clínicos

50 específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosis, tiempos, *etc.*, pueden determinarse por un experto en la técnica según justifique la situación clínica.

Los ejemplos de afecciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos de inducción de la muerte celular *in vivo* o *ex vivo* en poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidades de cualquier tipo que incluyen,

55 por ejemplo, cáncer de pulmón (de células pequeñas y de células no pequeñas), mama, colon, cerebro, próstata, riñón, páncreas, ovario, cabeza y cuello, piel (melanoma), carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, y cánceres de órganos linfáticos; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula

60 ósea; enfermedad injerto contra huésped; infecciones virales, tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, *etc.*; e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis, y otras determinadas por un experto en la técnica.

Las terapias contra el cáncer y sus dosis, vías de administración y uso recomendado son conocidos en la técnica y se han descrito en este tipo de bibliografía como la Guía de Referencia Médica (PDR). La PDR describe las dosis de los agentes que se han usado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. El régimen de dosificación y dosis de

estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer en particular que se trate, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para el médico de experiencia en la técnica y puede determinarse por el médico. Un experto en la técnica puede revisar la PDR, usando uno o más de los siguientes parámetros, para determinar el régimen de dosificación y dosis de los agentes quimioterapéuticos y conjugados que pueden usarse de acuerdo con las enseñanzas de esta invención. Estos parámetros incluyen:

- Índice integral
- Por el fabricante
- Productos (por nombre de la compañía o marca registrada del fármaco)
- Índice de la categoría
- Índice genérico/químico (nombres de los fármacos comunes sin marcas registradas)
- Imágenes a color de los medicamentos
- Información del producto, de acuerdo con la etiqueta FDA
- Información química
- Función/acción
- Indicaciones y Contraindicaciones
- Ensayo de investigación, efectos secundarios, advertencias

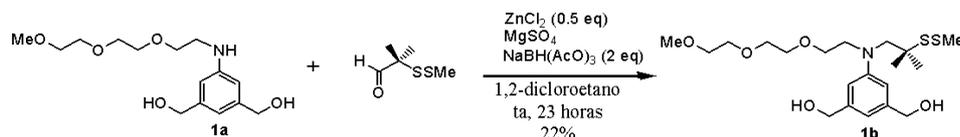
20 ANÁLOGOS Y DERIVADOS

Un experto en la técnica de agentes citotóxicos entenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente pueden modificarse de tal manera que el compuesto resultante todavía conserve la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El técnico con experiencia entenderá además que muchos de estos compuestos pueden usarse en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente. Así, los agentes citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente.

EJEMPLOS

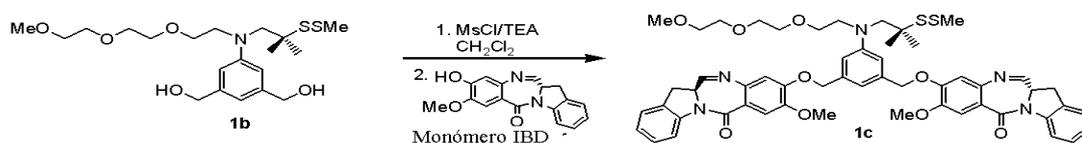
La invención se ilustrará ahora con referencia a ejemplos no limitantes. A menos que se indique de cualquier otra forma, todos los porcentajes, relaciones, partes, etc. son en peso. Todos los reactivos se compraron a Aldrich Chemical Co., Nueva Jersey, u otras fuentes comerciales. Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H RMN) se adquirieron de un instrumento de 400 MHz Bruker y los espectros de masas se adquirieron de un instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 usando ionización por electropulverización.

Ejemplo 1



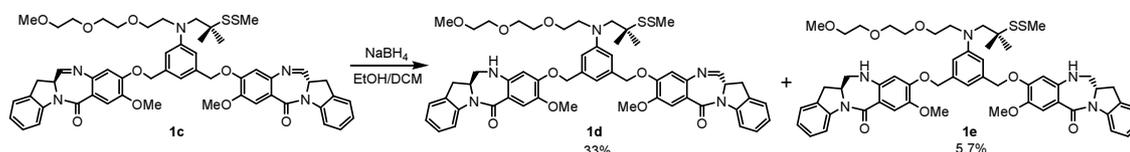
Compuesto **1b**:

A una disolución agitada de anilina **1a** (1,55 g, 5,18 mmoles) y 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 ml, 5,18 mmoles) en 1,2-diclorometano anhidro (20 mL) se añadió triacetoxiborohidruro sódico (1,1 g, 5,18 mmoles) y cloruro de cinc en polvo (353 mg, 2,59 mmoles) seguido por la adición de sulfato magnésico anhidro (800 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente (ta) durante 6 horas, después se añadió una segunda porción de 2-(metilditio)-isobutiraldehído (0,7 ml, 5,18 mmoles) y triacetoxiborohidruro sódico (1,1 g, 5,18 mmoles). Se continuó agitando a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y se lavó con diclorometano. El filtrado se concentró y el resto se purificó por cromatografía en gel de sílice (Combiflash, columna de 40 g, diclorometano/MeOH) para dar el compuesto **1b** (487 mg y = 22%) como un aceite incoloro. El material de partida sin reaccionar anilina **1a** (1,02 g) se recuperó además con 65% de rendimiento. ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z): encontrado 456,2 (M + Na) $^+$. Ver la FIG. 1.

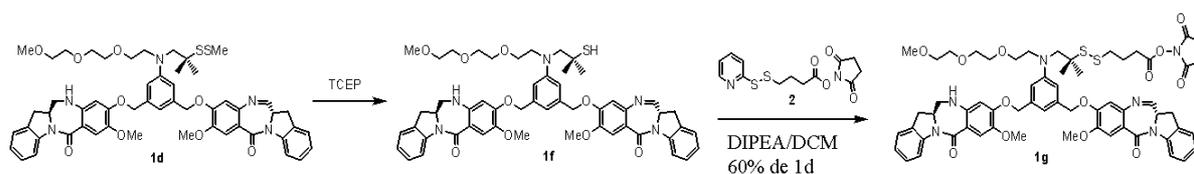


Compuesto 1c:

A una disolución agitada de **1b** (243 mg, 0,56 mmoles) en diclorometano anhidro (3,5 ml) se añadió trietilamina (234 μ l, 1,68 mmoles). La mezcla se enfrió hasta -10°C y se añadió cloruro de metanosulfonilo (113 μ l, 1,46 mmoles) lentamente durante 15 minutos a través de una jeringa. La disolución continuó agitándose durante 60 minutos a $-10 \sim -7^{\circ}\text{C}$ y se paró por la adición de hielo/agua. Se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua fría. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, se concentró y se sometió a alto vacío para dar los mesilatos como un aceite amarillento claro (340 mg). Los mesilatos se transfirieron a un matraz de fondo redondo de 10 ml con acetato de etilo/diclorometano, se concentraron y se sometieron a alto vacío. El monómero IBD (412 mg, 1,4 mmoles) se añadió seguido por la adición de dimetilformamida anhidra (3 ml) y carbonato potásico anhidro (232 mg, 1,68 mmoles). La mezcla amarillenta obtenida se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se diluyó con diclorometano y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró. El residuo se disolvió en diclorometano y se cargó en una columna de gel de sílice y se eluyó con diclorometano/metanol (15:1 después 10:1). Las fracciones que contenían el producto **1c** se combinaron y se concentraron para dar 705 mg del producto crudo el cual se purificó adicionalmente por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, eluida con acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **1c** como un sólido esponjoso amarillento (181 mg, $y = 33\%$). $^1\text{H RMN}$ (400 Hz, CDCl_3): δ 8,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,86 (d, $J = 3,6$ Hz, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,12 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,87-6,80 (m, 5H), 5,18 (dd, $J_1 = 20,8$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz, 4H), 4,50-4,47 (m, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,75-3,48 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (s, 6H); MS (m/z): encontrado 1025,9 ($M + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 1043,9 ($M + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 983,8 ($M - \text{H}$) $^-$, 1055,8 ($M + 4\text{H}_2\text{O} - \text{H}$) $^-$. Ver la FIG. 1.

**Compuesto 1d:**

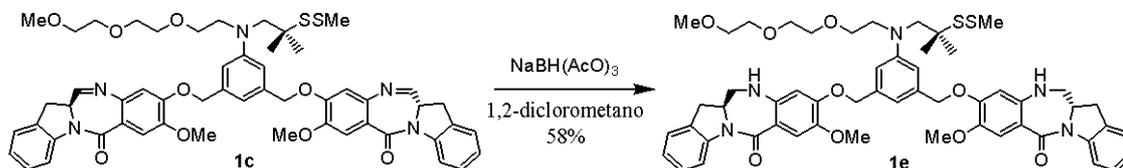
A una disolución agitada del compuesto **1c** (112 mg, 0,114 mmoles) en diclorometano anhidro (0,3 ml) y etanol absoluto (0,6 ml) se añadió borohidruro sódico (0,9 mg, 0,023 mmoles) a 0°C . El baño de hielo se retiró después de 5 minutos y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se enfrió hasta 0°C y se paró con cloruro amónico saturado, se diluyó con diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró a través de celita y se concentró. El residuo se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, acetonitrilo/agua). Las fracciones correspondientes se extrajeron con diclorometano y se concentraron para obtener los productos **1d**, **1e** y el material de partida sin reaccionar **1c**. Compuesto **1d**: 37,1 mg ($y = 33\%$), MS (m/z): encontrado 1010,4 ($M + \text{Na}$) $^+$, 1028,4 ($M + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 1040,3 ($M + 3\text{H}_2\text{O} - \text{H}$) $^-$; compuesto **1e**: 6,4 mg ($y = 5,7\%$), MS (m/z): encontrado 1012,4 ($M + \text{Na}$) $^+$; compuesto **1c**: 44,1 mg ($y = 39\%$). Ver la FIG. 1.

**Compuesto 1g:**

A una disolución agitada de **1d** (23,6 mg, 0,024 mmoles) en acetonitrilo (3 ml) y metanol (3 ml) se añadió disolución TCEP recientemente preparada (17 mg de sal HCl de TCEP se neutralizó con bicarbonato sódico saturado hasta pH 6-6,5 después se diluyó con 0,5 ml de tampón fosfato pH 6,5) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se diluyó con diclorometano y agua desionizada, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró. El filtrado se concentró y se sometió a alto vacío para dar 22 mg de **1f** como una espuma amarillenta clara. Otros 18 mg de **1f** se prepararon a partir de 19 mg de **1d** siguiendo el mismo procedimiento. Los 40 mg combinados (0,042 mmoles) de **1f** se disolvieron en diclorometano anhidro (0,5 ml) y se agitaron. A esta disolución agitada se añadió SPDB NHS éster **2** (34,6 mg, 80% de pureza, 0,085 mmoles) y diisopropiletilamina (15 μ l, 0,085 mmoles). Se continuó agitando a temperatura ambiente toda la noche, se paró con cloruro amónico saturado y se diluyó con diclorometano, se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, acetonitrilo/agua). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se extrajeron con diclorometano y se concentraron para dar el compuesto **1g** como un sólido blanco (29,7 mg, $y = 60\%$). $^1\text{H RMN}$ (400 Hz, CD_3CN): δ 8,28-8,25 (m, 1H), 8,20-8,17 (m, 1H), 7,87-7,84 (m, 1H), 7,49 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 7,39 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 7,31-7,19 (m, 4H), 7,13-7,01 (m, 2H), 6,92-6,87 (m, 3H), 6,77 (bs, 1H), 6,31-6,29 (m, 1H), 5,16-5,09 (m, 2H), 5,00 (d, $J = 4,4$ Hz, 2H), 4,94 (bs, -NH), 4,48-4,43 (m, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 3,90

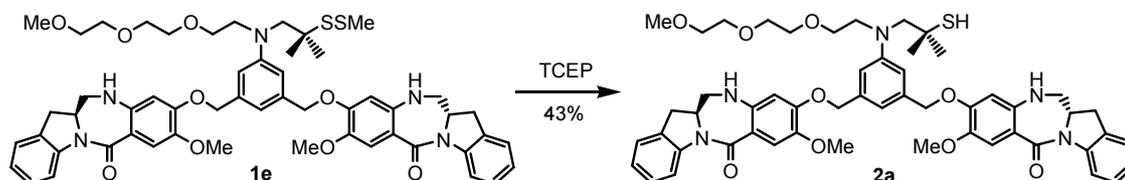
(d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,77 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,64-3,39 (m, 18H), 3,26 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 2,82-2,70 (m, 8H), 2,17 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 2,08-2,01 (m, 3H), 1,30 (d, J = 4,4 Hz, 6H); MS (m/z): encontrado 1025,9 (M + H₂O + Na)⁺, 1043,9 (M + 2H₂O + Na)⁺, 983,8 (M - H)⁻, 1055,8 (M + 4H₂O - H)⁻; MS (m/z), encontrado 1179,5 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 1.

5 Ejemplo 2



Compuesto 1e:

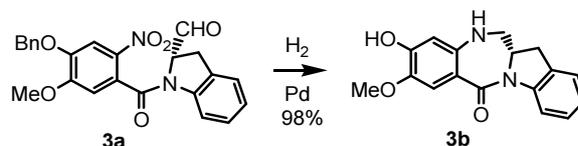
10 A una disolución agitada de **1c** (8 mg, 0,0081 mmoles) en 1,2-diclorometano anhidro (0,2 ml) se añadió triacetoxiborohidruro sódico (3,8 mg, 0,018 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas, después la mezcla se diluyó con diclorometano y se paró con bicarbonato sódico saturado, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, y se filtró. El filtrado se concentró y el resto se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **1e** como un sólido blanco (4,7 mg, y = 58%). MS (m/z), encontrado 1012,4 (M + Na)⁺, 1024,2 (M + 2H₂O - H)⁻. Ver la FIG. 2.



Compuesto 2a:

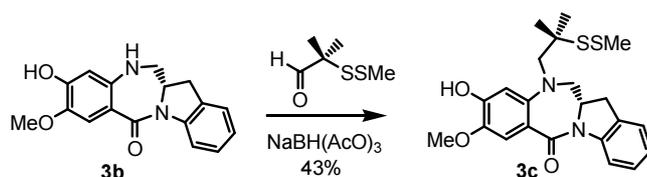
20 A una disolución agitada del compuesto **1e** (12 mg, 0,012 mmoles) en acetonitrilo (1 ml) y metanol (3 ml) se añadió disolución TCEP recientemente preparada (11 mg de sal HCl de TCEP se neutralizó con bicarbonato sódico saturado a pH ~6,5 y después se diluyó con 0,4 ml de tampón fosfato pH 6,5) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas y después se diluyó con diclorometano y agua desionizada, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró. El filtrado se concentró y el resto se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, acetonitrilo/agua) para dar el compuesto **2a** como un sólido blanco (4,9 mg, y = 43%). MS (m/z), encontrado 966,4 (M + Na)⁺, 978,2 (M + 2H₂O - H)⁻. Ver la FIG. 2.

30 Ejemplo 3

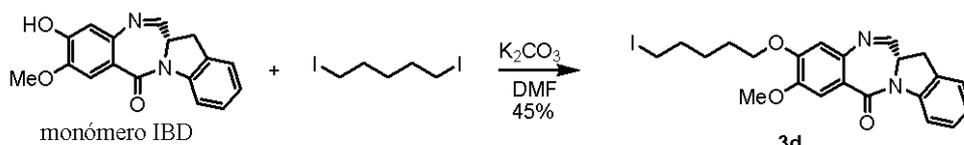


Compuesto 3b:

35 A una disolución del compuesto **3a** (830 mg, 1,9 mmoles) en metanol (15 ml) se añadió Pd/C (10%, 204 mg, 0,19 mmoles). El aire en el matraz se eliminó al vacío y después se reemplazó con hidrógeno en un balón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se filtró a través de celita y se lavó la celita/Pd/C con diclorometano y metanol. El filtrado se concentró y el residuo se diluyó con diclorometano y se evaporó durante unos cuantos ciclos y después se purificó por cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para dar el compuesto **3b** como un sólido amarillento claro (558 mg, y = 98%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 8,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,22 (dd, J₁ = 8,0 Hz, J₂ = 7,6 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,02 (dd, J₁ = 7,2 Hz, J₂ = 7,6 Hz, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,37 (tt, J₁ = 10,4 Hz, J₂ = 7,2 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,49-3,36 (m, 3H), 2,73 (dd, J₁ = 16,8 Hz, J₂ = 3,6 Hz, 1H); ¹³C RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 167,0, 150,4, 142,6, 141,2, 140,8, 129,9, 127,7, 124,8, 123,96, 117,4, 113,7, 112,5, 104,7, 57,3, 56,3, 54,7, 33,0; MS (m/z), encontrado 295,1 (M - H)⁻. Ver la FIG. 3.

**Compuesto 3c:**

5 A una disolución del 2-(metilditio)-isobutiraldehído (113 mg, 0,75 mmoles) y el compuesto **3b** (148 mg, 0,5 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (2 ml) se añadió triacetoxiborohidruro sódico (212 mg, 1,0 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Durante este tiempo, se añadieron otras dos porciones (0,05 ml, 0,5 mmol/porción) de 2-(metilditio)-isobutiraldehído junto con una porción de triacetoxiborohidruro sódico (106 mg, 0,5 mmoles). La reacción se paró con bicarbonato sódico saturado, se diluyó con diclorometano y agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Combiflash, columna de 24 g, hexanos/acetato de etilo) para dar el compuesto **3c** como un sólido esponjoso blanco (92,5 mg, $y = 43\%$). Además se recogió el material de partida sin reaccionar **3b** (49,3 mg, $y = 33\%$). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,30 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,28 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, 1H), 7,25-7,20 (m, 2H), 7,07 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,17 (s, 1H), 4,36-4,28 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,78 (d, $J = 14,4$ Hz, 1H), 3,46-3,34 (m, 3H), 2,90 (d, $J = 14,4$ Hz, 1H), 2,73 (dd, $J_1 = 16,4$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,05 (s, 3H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 167,2, 149,0, 142,5, 142,2, 141,9, 129,9, 128,0, 125,3, 124,5, 124,1, 117,1, 112,0, 108,5, 64,8, 61,4, 58,1, 56,3, 53,4, 32,0, 26,3, 25,7, 25,4; MS (m/z), encontrado 453,3 ($M + \text{Na}^+$), 429,2 ($M - \text{H}$). Ver la FIG. 3.

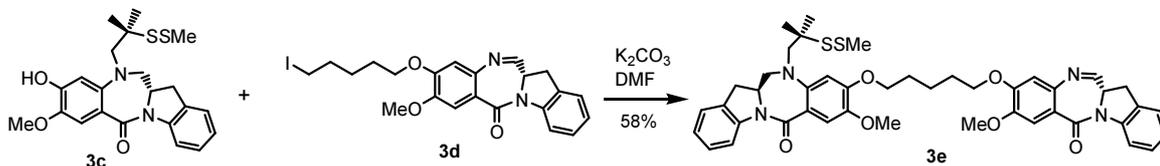


20

Compuesto 3d:

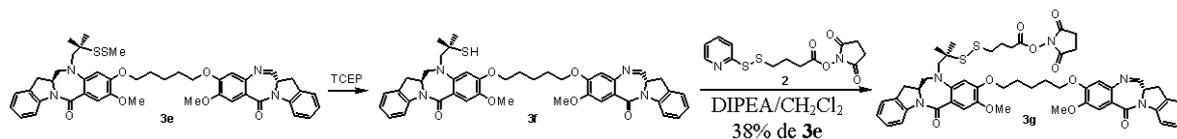
25 A una disolución agitada de monómero de IBD (125 mg, 0,425 mmoles) y 1,5-diyodopentano (0,63 ml, 4,25 mmoles) en dimetilformamida anhidra (3 ml) se añadió carbonato potásico (59 mg, 0,425 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La disolución de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Ésta se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para dar el compuesto **3d** como una espuma amarillenta (94 mg, $y = 45\%$). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,27 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,27 (dd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, 2H), 7,10 (dd, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,48 (dt, $J_1 = 10,8$ Hz, $J_2 = 4,4$ Hz, 1H), 4,15-4,07 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,70 (dd, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz, 1H), 3,49 (dd, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz, 1H), 3,22 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,96-1,87 (m, 4H), 1,64-1,57 (m, 2H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 164,0, 163,2, 151,4, 148,3, 142,2, 140,3, 129,6, 128,3, 124,9, 120,5, 117,0, 112,0, 110,6, 68,8, 56,4, 55,1, 33,3, 32,7, 28,0, 27,2, 6,6; MS (m/z), encontrado 513,3 ($M + \text{Na}^+$), 543,2 ($M + 3\text{H}_2\text{O} - \text{H}$). Ver la FIG. 3.

35

**Compuesto 3e:**

40 A una disolución agitada de los materiales de partida **3c** (91 mg, 0,21 mmoles) y **3d** (94 mg, 0,19 mmoles) en dimetilformamida anhidra (1 ml) se añadió carbonato potásico (29 mg, 0,21 mmoles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La disolución de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Ésta se filtró, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para dar el compuesto **3e** como una espuma amarillenta (89,1 mg, $y = 58\%$). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,32-8,28 (m, 2H), 7,91 (bs, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,36-7,21 (m, 5H), 7,15-7,05 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,53-4,48 (m, 1H), 4,37-4,31 (m, 1H), 4,21-4,03 (m, 4H), 3,98 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,86-3,70 (m, 2H), 3,55-3,35 (m, 4H), 2,93 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 2,73 (dd, $J_1 = 16,4$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,03-1,96 (m, 3H), 1,77-1,67 (m, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,06 (s, 3H); MS (m/z), encontrado 815,3 ($M + \text{Na}^+$). Ver la FIG. 3.

45

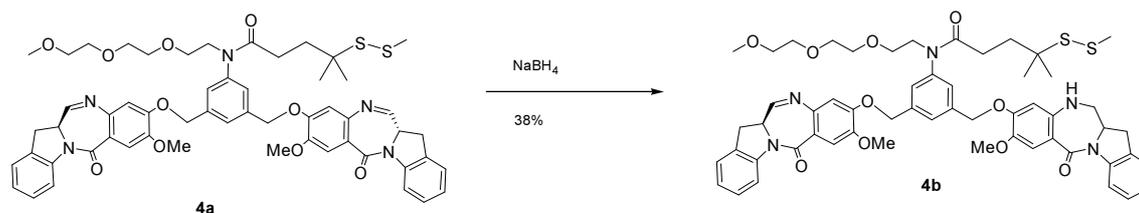


Compuesto 3g:

- 5 A una disolución agitada del compuesto **3e** (33,1 mg, 0,042 mmoles) en acetonitrilo (2 ml) y metanol (4 ml) se añadió disolución TCEP recientemente preparada (36 mg de sal HCl de TCEP se neutralizó con bicarbonato sódico saturado a pH ~6,5 y después se diluyó con 0,4 ml de tampón fosfato pH 6,5) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se diluyó con diclorometano y agua desionizada, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se filtró. El filtrado se concentró y se sometió a alto vacío para dar 31 mg del compuesto **3f** como un sólido amarillento. Éste se disolvió en diclorometano anhidro (0,5 ml). Se añadieron posteriormente SPDB NHS éster **2** (26 mg, 80% de pureza, 0,063 mmoles) y diisopropiltilamina (11 μ l, 0,063 mmoles). La mezcla continuó agitándose a temperatura ambiente toda la noche, se paró con cloruro amónico saturado y se diluyó con diclorometano, se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, acetonitrilo/agua). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se extrajeron con diclorometano y se concentraron para dar el compuesto **3g** como un sólido amarillento (15,2 mg, y = 38%). MS (m/z), encontrado 984,3 (M + Na)⁺, 1014,2 (M + 3H₂O - H)⁻. Ver la FIG. 3.

Ejemplo 4

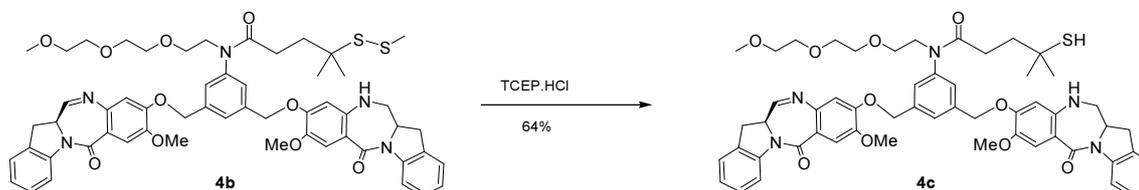
20



Compuesto 4b:

- 25 Una disolución agitada del compuesto **4a** (111 mg, 0,108 mmoles) en etanol absoluto (720 μ l) y diclorometano anhidro (360 μ l) se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadió borohidruro sódico (0,817 mg, 0,022 mmoles) en 50 μ l de etanol absoluto a 0°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo, se paró con cloruro amónico saturado y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro y se filtraron a través de celita. El filtrado se concentró a presión reducida y el material crudo se purificó por RP-HPLC (C18 agua DI/acetonitrilo) para producir el compuesto **4b** (43mg, 38%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 8,26 (d, 1H, J = 8,0Hz), 8,18 (d, 1H, J = 8,0Hz), 7,77 (d, 1H, J = 4,4 Hz), 7,51 (s, 1H), 7,41 (s, 2H), 7,17 (m, 6H), 7,03 (t, 1H, J = 7,2Hz), 6,96 (t, 1H, J = 7,2Hz), 6,76 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,13 (m, 4H), 4,38 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,79 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 3,51 (m, 8H), 3,43 (m, 6H), 3,25 (s, 3H), 2,73 (dd, 1H, J = 3,6, 16,4Hz), 2,22 (s, 3H), 2,04 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,18 (s, 6H); MS (m/z) encontrado, 1051,9 (M+Na), 1069,9 (M+Na+H₂O). Ver la Figura 4.

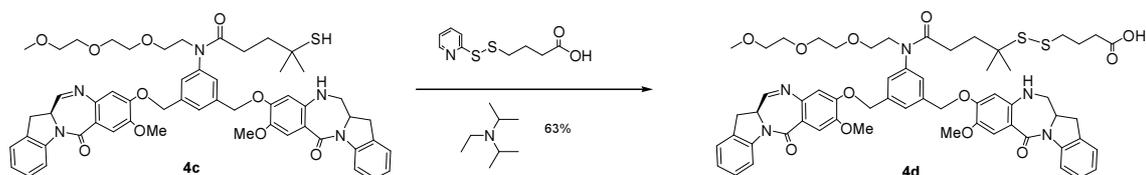
35



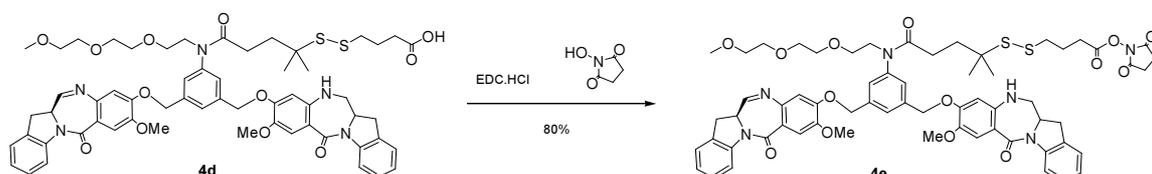
Compuesto 4c:

40

- 45 A una disolución agitada del compuesto **4b** (40 mg, 0,039 mmoles) en metanol (4,45 ml) y acetonitrilo (2,225 ml) se añadió TCEP.HCl (39,0 mg, 0,136 mmoles) en tampón fosfato sódico (0,89ml, pH 6,5). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se diluyó con diclorometano y se lavó con agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. La purificación por RP-hPLC (C18, agua DI/acetonitrilo) y la extracción con diclorometano produjo el compuesto **4c** (26,5mg, 64%); MS (m/z) encontrado, 1006,0 (M+Na). Ver la Figura 4.

**Compuesto 4d:**

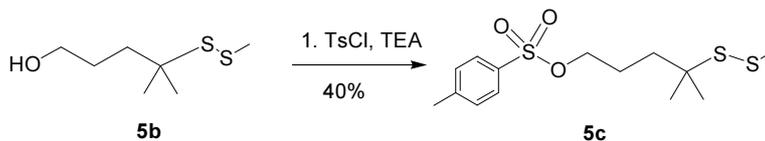
- 5 A una disolución agitada del compuesto **4c** (24 mg, 0,024 mmoles) en diclorometano anhidro (800 μ l) se añadió PBA (11,18 mg, 0,049 mmoles) y diisopropiletilamina (20,18 μ l, 0,116 mmoles). Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente la reacción se diluyó con diclorometano y se paró con cloruro amónico saturado. Las capas se separaron y el producto orgánico se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación por PTLC (5% metanol/diclorometano) produjo el compuesto **4d** (17mg, 63%); MS (m/z) encontrado, 1123,9 (M+Na) 1139,9 (M+K); 1099,8 (M-H) 117,9 (M-H+H₂O). Ver la FIG. 4.

**Compuesto 4e:**

- 15 A una mezcla del compuesto **4d** (15 mg, 0,014 mmoles) y N-hidroxi succinimida (4,70 mg, 0,041 mmoles) en diclorometano anhidro (1,0 ml) se añadió EDC.HCl (7,83 mg, 0,041 mmoles). Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente la reacción se diluyó con diclorometano y se paró con cloruro amónico saturado. La mezcla se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El material crudo se purificó por RP-HPLC (C18, agua DI/acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto se concentraron y se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto **4e** (13 mg, 80%); MS (m/z) encontrado, 1220,8 (M+Na) 1238,8 (M+Na+H₂O), 1254,8 (M+K+H₂O). Ver la FIG 4.

Ejemplo 5

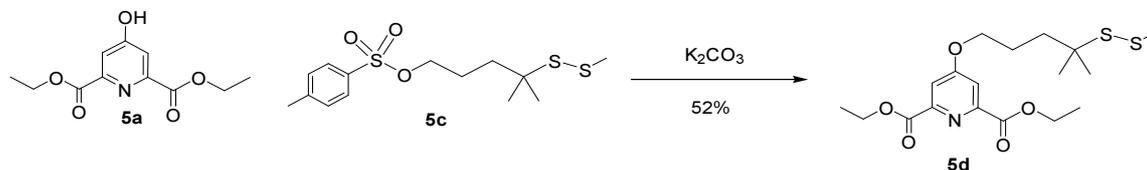
- 25
-
- 30 Una mezcla de ácido quelidámico hidrato (3,0 g, 15,56 mmoles) y ácido sulfúrico (0,6 ml, 11,26 mmoles) en etanol absoluto (40 ml) se sometió a reflujo durante 20 horas. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se neutralizó con carbonato sódico acuoso, y después se acidificó con HCl concentrado. Se añadió agua y la mezcla se extrajo con diclorometano. Los extractos se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron. El material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice (5% metanol/diclorometano) para producir dietil 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato (**5a**) (2,5 g, 68%) como un sólido blanco. Ver la FIG. 5.

Compuesto 5a:**Compuesto 5c:**

- 40 Una disolución de 4-metil-4-(metildisulfanil)pentan-1-ol (**5b**) (2,0 g, 11,09 mmoles) en diclorometano anhidro (55,5 ml) se enfrió hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadieron trietilamina (5,41 ml, 38,8 mmoles) y sulfonil cloruro de tolueno (3,17 g, 16,64 mmoles) a 0 °C. La reacción se agitó durante tres horas a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y se lavó con salmuera. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron. La purificación por cromatografía en gel de sílice (5% acetato de etilo/hexanos) resultó en 4-metil-4-(metildisulfanil)pentil 4-metilbencenosulfonato (**5c**) (1,5g, 40%). **5b**: ¹H RMN (400

45

Hz, CDCl₃): δ3,42 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 1,77 (bs, 1H), 1,43 (m, 4H), 1,09 (s, 6H). **5c**: ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ7,66 (d, 2H, *J*=7,6Hz), 7,22 (d, 2H, *J*=8,0Hz), 3,90 (t, 2H, *J* = 6,4Hz), 2,32 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,60 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 1,11 (s, 6H). Ver la FIG. 5.

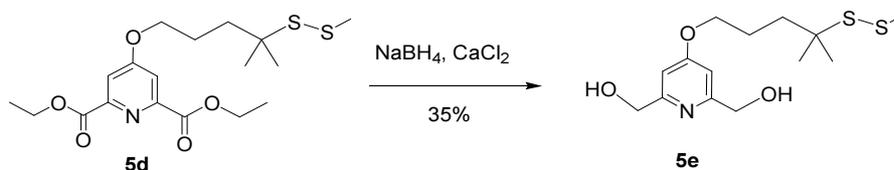


5

Compuesto **5d**:

A una disolución agitada de 4-metil-4-(metildisulfanil)pentil 4-metilbencenosulfonato (**5c**) (0,48 g, 1,435 mmoles) y dietil 4-hidroxipiridina-2,6-dicarboxilato (**5a**) (0,343 g, 1,435 mmoles) en dimetilformamida anhidra (6,5 ml) se añadió carbonato potásico (0,297 g, 2,152 mmoles). La reacción se agitó a 90 °C durante 18 horas. Después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se paró con cloruro amónico saturado. La mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía en gel de sílice (30% hexanos/acetato de etilo) produjo dietil 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentiloxi)piridina-2,6-dicarboxilato (**5d**) (300 mg, 52%); ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,70 (s, 2H), 4,40 (q, 4H, *J* = 7,2, 14,4Hz), 4,07 (t, 2H, *J*=6, Hz), 2,35 (s, 3H), 1,86 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,38 (t, 6H, *J*=7,2Hz), 1,27 (s, 6H); MS (*m/z*), encontrado 424,1 (M+Na), 440,1 (M+K). Ver la Figura 5.

15



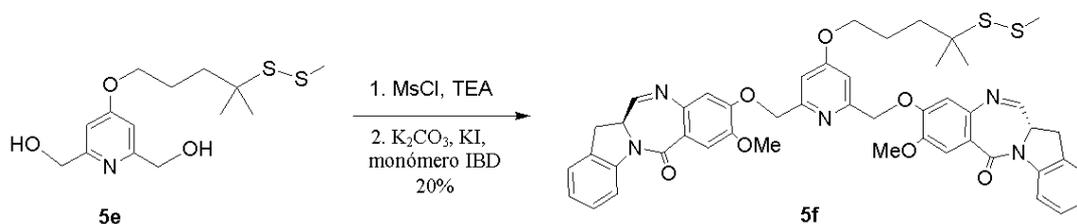
20

Compuesto **5e**:

A una disolución agitada de dietil 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentiloxi)piridina-2,6-dicarboxilato (**5d**) (270 mg, 0,672 mmoles) en etanol absoluto (7,0 ml) se añadió cloruro cálcico (224 mg, 2,017 mmoles) y borohidruro sódico (76 mg, 2,017 mmoles). La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 90 minutos después de lo cual ésta se paró con agua y se concentró *al vacío* para eliminar el etanol. La mezcla se extrajo después dos veces con diclorometano. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se secaron con sulfato magnésico anhidro y se filtraron a través de celita. El filtrado se concentró a presión reducida y el material crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con 10% metanol/diclorometano para producir 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentiloxi)piridina-2,6-diol (**5e**) (75 mg, 35%); ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 6,63 (s, 2H), 4,60 (s, 4H), 3,95 (t, 2H, *J* = 6,2Hz), 3,54 (bs, 2H), 2,35 (s, 3H), 1,82 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,26 (s, 6H); MS (*m/z*), encontrado 340,1 (M+Na). Ver la FIG. 5.

25

30



35

Compuesto **5f**:

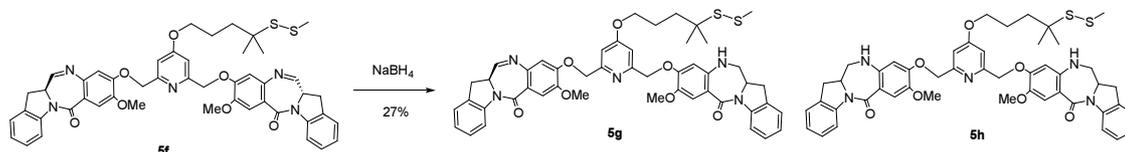
Una disolución agitada de 4-(4-metil-4-(metildisulfanil)pentiloxi)piridina-2,6-diol (**5e**) (51 mg, 0,161 mmoles) en diclorometano anhidro (1,6 ml) se enfrió hasta -5 °C en un baño de acetona/hielo. Se añadieron trietilamina (0,112 ml, 0,803 mmoles) y cloruro de metanosulfonilo (0,031 ml, 0,402 mmoles). La mezcla se agitó durante 60 minutos a -5 °C. La reacción se paró con agua helada y se extrajo con acetato de etilo frío. Los extractos orgánicos se lavaron con agua helada, se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el dimesilato. A una mezcla agitada del dimesilato intermedio (179 mg, 0,378 mmoles) y monómero IBD (256 mg, 0,869 mmoles) en dimetilformamida anhidra (3,8ml) se añadió carbonato potásico (261 mg, 1,890 mmoles) y yoduro potásico (31,4 mg, 0,189 mmoles). La reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se paró con agua y se extrajo tres veces con diclorometano. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron. El material crudo se disolvió nuevamente en acetonitrilo y

40

45

se purificó por RP-HPLC (C18, agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se extrajeron con diclorometano, se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para producir el compuesto **5f** (65 mg, 20%); ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,20 (d, 2H, $J = 8,0\text{Hz}$), 7,78 (m, 2H), 7,53 (s, 2H), 7,20 (m, 4H), 7,04 (t, 2H, $J = 7,4\text{Hz}$), 6,91 (m, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,22 (s, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,94 (s, 6H), 3,93 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,42 (dd, 2H, $J = \text{Hz}$), 2,32 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H); MS (m/z), encontrado 892,3 (M+Na) 910,3 (M+Na+H₂O) 928,3 (M+Na+2H₂O). Ver la FIG. 5.

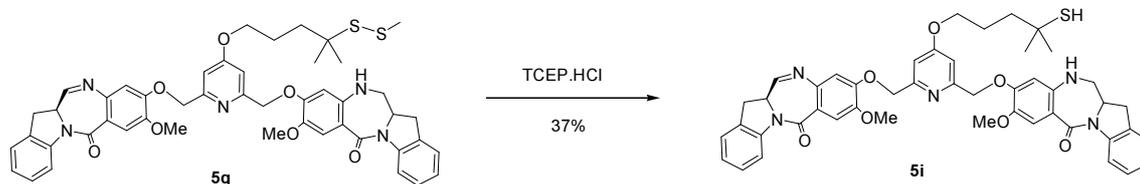
5



10 **Compuesto 5g y 5h:**

Una disolución de compuesto **5f** (74 mg, 0,085 mmoles) en etanol absoluto (600 μl) y diclorometano anhidro (300 μl) se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se añadió borohidruro sódico (0,644 mg, 0,017 mmoles) en 50 μl de etanol absoluto a 0 °C. La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante dos horas y se enfrió después hasta 0 °C. La reacción se paró con cloruro amónico saturado y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron a través de celita y se concentraron a presión reducida. El material crudo se disolvió nuevamente en dimetilformamida y se purificó por RP-HPLC (C18 agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones que contenían los compuestos **5g** y **5h** se combinaron separadamente y se extrajeron con diclorometano, se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron para producir el compuesto **5g** (20 mg, 27%) y el compuesto **5h**. **5g**: ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,25 (m, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,77 (m, 1H), 7,51 (ss, 1H), 7,40 (ss, 1H), 7,18 (m, 4H), 7,08 (m, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,92 (m, 2H), 6,86 (ss, 1H) 5,98/6,06 (ss, 1H), 5,24 (m, 4H), 4,40 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,37 (m, 4H), 2,65 (m o dd, 1H), 2,32 (ss, 3H), 1,77 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). **5h**: ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,24 (d, 2H, $J = 8,0\text{Hz}$), 7,39 (s, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,97 (m, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,15 (ss, 2H), 5,25 (s, 4H), 4,37 (m o t, 2H, $J=9,8\text{Hz}$), 4,2 (bs, 2H), 3,94 (m, 2H), 3,83 (s, 6H), 3,40 (m, 6H), 2,72 (dd, 2H, $J = \text{Hz}$), 2,32 (s, 3H), 1,79(m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). Ver la FIG. 5.

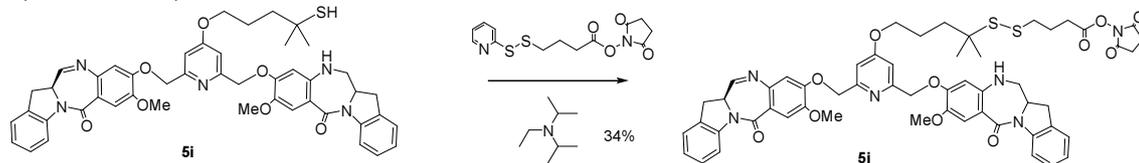
25



30 **Compuesto 5i:**

A una disolución agitada del compuesto **5g** (20 mg, 0,023 mmoles) en metanol (5,25 ml) y acetonitrilo (1,750 ml) se añadió TCEP.HCl (19,72 mg, 0,069 mmoles) en tampón de fosfato sódico (0,7ml, pH 6,5). La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y después se diluyó con diclorometano y agua. Las capas se separaron y el producto orgánico se lavó con salmuera. El producto crudo se purificó por RP-HPLC (C18, agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, extrajeron con diclorometano y se evaporaron para producir el compuesto **5i** (7 mg, 37%). MS (m/z), encontrado 848,3 (M+Na) 866,3 (M+Na+H₂O) 880,3 (M+Na+MeOH). Ver la FIG. 5.

35



40

Compuesto 5j:

A una disolución agitada del compuesto **5i** (7 mg, 8,47 μmoles) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoato (8,64 mg, 0,021 mmoles) en diclorometano anhidro (113 μl) se añadió diisopropiletamina (3,69 μl , 0,021 mmoles). Después de agitar durante 18 horas a temperatura ambiente la reacción se paró con disolución de cloruro amónico saturado y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material crudo se purificó por RP-HPLC preparativa (C18, agua desionizada/acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto se extrajeron con diclorometano, se filtraron y se evaporaron para producir el compuesto **5j** (3 mg, 34%). MS (m/z), encontrado 1063,3 (M+Na) 1081,3 (M+Na+H₂O). Ver la Figura 5.

50

Ejemplo 6

Preparación del conjugado anticuerpo-SPDB-fármaco:

5 El compuesto **1g** se pre-trató con 3 equivalentes molares de bisulfito sódico (usando una disolución recientemente preparada de NaHSO₃ en agua) con 96-98% de DMA en agua durante 4-5 h a 25 °C. Para la conjugación, el anticuerpo humanizado a 2 mg/ml reaccionó con 5-7 equivalentes molares del compuesto **1g** (pre-tratado con NaHSO₃) durante 6 h a 25 °C en 85-90% de PBS, pH 7,4, tampón acuoso, ó 50 mM HEPES, pH 8,5, tampón acuoso, que contiene 10-15% de *N,N*-dimetilacetamida (DMA) y se purificó después en una columna de gel filtración G25 en PBS, pH 7,4, para eliminar el compuesto no reactivo o hidrolizado. Los conjugados de anticuerpo humanizado-SPDB-fármaco se dializaron en tampón de 10 mM de Histidina, 250 mM de Glicina, 1% de sacarosa, pH 6,5. Se midió que la relación fármaco anticuerpo (DAR) de los conjugados era 2,2-2,9 por mediciones de absorbancia UV a 280 y 320 nm y usando los coeficientes de extinción del fármaco y anticuerpo a 280 nm (215.000 M⁻¹cm⁻¹) y 320 nm (9.137 M⁻¹cm⁻¹). El porcentaje de monómero en los conjugados se determinó como >90% por SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) usando la columna TSK-Gel G300SWXL (7,8 mm × 300 mm, 5 μm tamaño de partícula). Basado en la absorbancia UV del pico de monómero en SEC se demostró además que los picos del conjugado monómero tenían moléculas de fármaco enlazadas. Para el ensayo de fármaco libre (sin conjugar), el conjugado se extrajo con acetona para eliminar la proteína, se secó, y reconstituyó en la fase móvil e inyectó en una columna HPLC de fase reversa VYDAC 208TP C8 (4,6 × 250 mm, 7 μm tamaño de partícula) y se comparó con los estándares. El porcentaje del compuesto de fármaco libre en el conjugado se determinó como <0,5% del compuesto fármaco conjugado. Ver la FIG. 22.

Preparación del conjugado Ab humanizado-SPDB-**2a**:

25 El Ab humanizado a 8 mg/ml se derivatizó con 4-6 equivalentes molares del enlazador heterobifuncional SPDB durante 1,5 h a 25 °C en 95% PBS, pH 7,4, que contiene 5% de DMA (v/v), y se purificó después sobre una columna de desalinización G25 en tampón citrato (35 mM tampón citrato, pH 5,5, que contiene 2 mM de EDTA, 150 mM de NaCl) para eliminar el enlazador sin reaccionar. Las LAR (relación enlazador anticuerpo) se midieron usando la absorbancia UV a 280 y 343 nm sin y con la adición de 50 mM de ditiotreitól (para medir el anticuerpo total y SPy liberada por ditiotreitól) y se determinó que era 2,7-4,1 LAR. El SPDB-anticuerpo modificado a 2 mg/ml reaccionó con 2 equivalentes molares del compuesto **2a** (sal HCl) por SPDB enlazado durante 20 h a temperatura ambiente en 85% tampón citrato, 15 % de DMA (v/v) y se purificó después sobre una columna de desalinización G25 en PBS, pH 7,4 para eliminar el compuesto fármaco sin conjugar. La DAR del conjugado de Ab humanizado-SPDB-**2a** final se midió por espectrofotometría UV a 280 y 350 nm y se calculó que era ~1,7-2,1 DAR. El porcentaje de monómero y compuesto fármaco enlazado en el monómero en el conjugado se determinó mediante HPLC usando una columna SEC (cromatografía de exclusión por tamaño). Ver la FIG. 23.

Ejemplo 7

40 Potencia *in vitro* de los fármacos libres y conjugados:

Procedimiento general usado: Las muestras de compuestos de fármacos libres sin conjugar o conjugados de fármacos se añadieron a placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos y se titularon usando diluciones en serie para cubrir el intervalo molar deseado. Las células positivas al antígeno (Ag⁺) o negativas al antígeno (Ag⁻) se añadieron a los pocillos en las densidades de células específicas, de tal manera que había muestras por triplicado para cada concentración de fármaco para cada línea celular correspondiente. Las placas se incubaron después a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 4-5 días dependiendo de la línea celular. COLO 205 (1.000 células/pocillo), Namalwa (3.000 células/pocillo), HEL 92,1,7 (3.000 células/pocillo) – 4 días; RH30 (1.000 células/pocillo), HL60/QC (5.000 células/pocillo), Ramos (10.000 células/pocillo), KB (2.000 células/pocillo), BJAB (2.000 células/pocillo), NB4 (3.000 células/pocillo) – 5 días, RPMI 8226 (8.000 células/pocillo) – 6 días.

Al final del periodo de incubación, las potencias citotóxicas se evaluaron después usando un ensayo de viabilidad celular basado en WST-8 y las células supervivientes se midieron por el desarrollo con WST-8 (2-7 horas). La absorbancia en cada pocillo se midió y se representó gráficamente la fracción superviviente de células a cada concentración para revelar la citotoxicidad y/o especificidad de antígeno (de los conjugados).

Usando el procedimiento general descrito anteriormente, la citotoxicidad de los compuestos del fármaco libre sin conjugar se midió contra siete líneas celulares: KB, una contaminante de células HeLa, HL60/QC, una línea celular de leucemia mieloide aguda, Namalwa, una línea celular de linfoma de Burkitt, NB4, una línea celular de leucemia promielocítica aguda, HEL92.1.7, una línea celular de eritroleucemia, RPMI8226, una línea celular de mieloma múltiple y BJAB, línea celular de la leucemia de células B. Los resultados, que se muestran en la FIG. 24 y en la Tabla 10 demuestran la alta potencia de estos compuestos a través de una amplia variedad de tipos de células. La potencia y especificidad de los conjugados anticuerpo-fármaco se midieron contra las células que expresan el antígeno, con y sin las adiciones de una cantidad en exceso de anticuerpo de bloqueo sin conjugar para mostrar la especificidad del efecto letal. El conjugado MY9-6-fármaco fue extremadamente potente hacia tres células diferentes que expresan el antígeno: HL60/ATCC, HL60/QC y NB-4, a pesar de la muy baja expresión de antígenos en células

NB4, La potencia específica pudo bloquearse por la adición de un exceso de anticuerpo sin conjugar, demostrando que el efecto de la muerte celular es específico al antígeno. Del mismo modo, el conjugado huFOLR1-fármaco fue eficaz para matar de una manera específica las células KB que expresan el antígeno. Los resultados se ilustran en las FIGs. 25 y 26,

5 Tabla 10. Potencia de fármacos libres contra diversas líneas celulares. Los valores CI_{50} que se enumeran en la tabla están en la unidad de nM.

	Namalwa	KB	HL60/QC	NB4	HEL92.1.7	RPMI8226	BJAB
1c	0,056	0,16	0,023				
1d	0,069	0,18	0,032				
1e	2,4	>3,0	0,67				
27d		0,23	0,05	0,039	0,14	0,07	0,04
27e		0,39	0,09	0,13	0,2	0,24	0,12
27f		4,4	1,7	1,1	1,8	>3,0	1
29a	0,002	0,004	0,001	0,0023	0,0031	0,011	0,001
29b	0,003	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005	0,003
29c	0,013	0,057	0,03	0,023	0,027	0,16	0,015

10 Se han obtenido además resultados similares usando diferentes líneas celulares y diferentes conjugados de la invención, que incluyen: huMY9-6-SPDB-1f contra células HL60/QC (Ag^+), células HL60/ATCC (Ag^+), y células NB-4 (Ag^+) (FIG. 25); huFOLR1-SPDB-1f contra células KB (Ag^+) (FIG. 26); huMY9-6-SPDB-1f contra células HL60/QC positivas al antígeno, células HL60/ATCC, células NB-4, y células HEL 92.1.7 (FIG. 29); huMy9-6-SPDB-1f, huMy9-6-sulfoSPDB-1f, y huMy9-6-BMPS-1f contra células HL60/QC (Ag^+) (FIG. 34); chB38,1-SPDB-1f y chB38,1-sulfoSPDB-1f contra células COLO205 (Ag^+) (FIG. 35); huMy9-6-SPDB-1f, huMy9-6-sulfoSPDB-1f, y huMy9-6-BMPS-1f contra células OCI-AmL3 (Ag^+) (FIG. 44). Además, ver la FIG. 49 para la potencia de diversos conjugados contra diversas líneas celulares, expresadas como valores CI_{50} (nM). Obsérvese que en las FIGs. 25, 29, 34, 35, y 44, los conjugados se prepararon en presencia de bisulfito sódico.

20 Para comparar las mediciones de la potencia *in vitro* de los conjugados objeto preparados con y sin reactivo de imina reactiva, tal como bisulfito sódico, huMy9-6-BMPS-1f, huMy9-6-sulfo-SPDB-1f, y huMy9-6-fármaco 2 se prepararon con y sin bisulfito sódico usando el método de sulfonación *in situ* (en donde los compuestos respectivos de la invención se mezclaron primero con bisulfito sódico y un agente de entrecruzamiento bifuncional que porta un grupo reactivo, después la mezcla de reacción, sin purificación adicional, se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal huMy9-6 como el agente de unión celular). Las CI_{50} de los conjugados en las células HL60-QC se muestran más abajo. Los datos indican que la inclusión del grupo reactivo imina (tales como bisulfito sódico) en la etapa de preparación del conjugado no repercute negativamente en la potencia *in vitro* de los conjugados objeto.

Conjugado	Tratamiento con $NaHSO_3$	CI_{50} (pM)	CI_{50} (pM) de huMy9-6 de bloqueo
huMy9-BMPS-1f	-	2	130
	+	1,5	55
huMy9-6-sulfo-SPDB-1f	-	5,6	1.200
	+	7,1	610
huMy9-6-Fármaco 2	-	16	> 3.000
	+	6,8	> 3.000

30 Es evidente que el tratamiento previo de los compuestos del fármaco con bisulfito sódico (5 equivalentes molares, 22 h, 4 °C, 90:10 DMA: agua pH 5,5) antes de la conjugación con huMy9-6 no tuvo efecto significativo sobre la potencia de los conjugados *in vitro* dependiente de antígeno o independiente de antígeno (bloqueo del antígeno con 1 μ M de huMy9-6 sin conjugar).

35 Ejemplo 8

La unión del conjugado anticuerpo-fármaco es similar a la del anticuerpo sin modificar:

La unión del conjugado huMY9-6-fármaco se comparó con la del anticuerpo huMY9-6 sin modificar contra las células HL60/QC que expresan el antígeno usando citometría de flujo. En resumen, las células positivas al antígeno se incubaron a 4°C con conjugados o anticuerpos sin modificar, después con un conjugado de anticuerpo secundario-FITC a 4°C, se fijaron con formaldehído (1% en PBS) y analizaron por citometría de flujo. No se observó ninguna diferencia significativa entre la unión del conjugado frente a la del anticuerpo sin modificar. Un ejemplo se muestra en la FIG. 27, donde el conjugado huMY9-6-fármaco se une a las células positivas al antígeno con una alta afinidad similar a la del anticuerpo sin modificar.

Ejemplo 9

Eficacia *in vivo* del conjugado huMY9-6-SPDB-1f en ratones desnudos que portan el tumor HL60/QC:

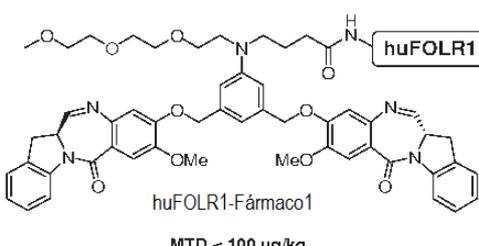
En este estudio, la actividad antitumoral de huMY9-6-SPDB-1f se investigó en ratones hembra desnudos que portan tumores HL60/QC, un modelo de leucemia mieloide aguda humana. Las células tumorales HL60/QC, 2 × 10⁶ células/ratón se inocularon por vía subcutánea en un volumen de 0,1 ml/ratón en el área sobre el hombro derecho de ratones desnudos hembra atímicos, de 5 semanas de edad. Ocho días después de la inoculación de células tumorales los ratones se aleatorizaron en grupos (n = 6 por grupo) por volumen tumoral. El tratamiento se inició el día de la aleatorización, y los grupos incluyeron un grupo de control dosificado con PBS (200 µl/inyección), o un solo tratamiento a diversas dosis (5 a 100 µg/kg) de huMY9-6-SPDB-1f (dosis de 50 µg/kg 1f correspondieron a dosis de anticuerpo de 2,5 mg/kg). Todos los tratamientos se toleraron bien con las pérdidas de peso corporal medio comparables con la pérdida observada en los ratones de control con PBS. El volumen tumoral medio en función del tiempo se muestra (FIGS. 28 y 36) con los datos que demuestran una actividad anti-tumoral dependiente de la dosis del conjugado huMY9-6-SPDB-1f. La dosis mínima efectiva se estimó que era 20 µg/kg, que es aproximadamente 35 veces inferior que la dosis máxima tolerada.

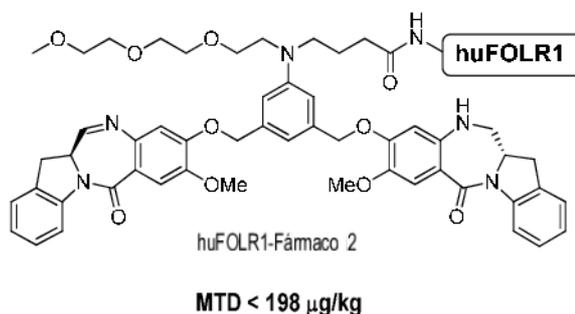
Ejemplo 10

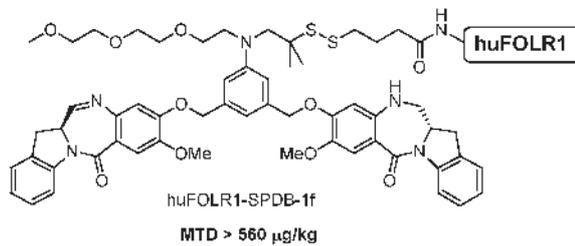
La tolerabilidad de los conjugados huFOLR-1 se investigó en ratones hembras CD-1. Los animales se observaron siete días antes del inicio del estudio y se encontró que carecían de enfermedades o afecciones. A los ratones se le administró una única inyección *i.v.* del conjugado y los animales se monitorizaron diariamente para la pérdida de peso corporal, morbilidad o mortalidad. La Tabla 9 muestra que para el huFOLR1-fármaco1 el conjugado se toleró sólo a la dosis mínima probada de 50 µg/kg. Por el contrario, se encontró que los conjugados mono-imina huFOLR1-Fármaco 2 y huFOLR1-SPDB-1f eran mejor tolerados con una dosis máxima tolerada de <198 µg/kg y >560 µg/kg respectivamente.

Tabla 9. Datos de comparación de tolerabilidad para los conjugados (A) huFOLR1-fármaco1, (B) huFOLR1-Fármaco 2, y (C) huFOLR1-SPDB-1f.

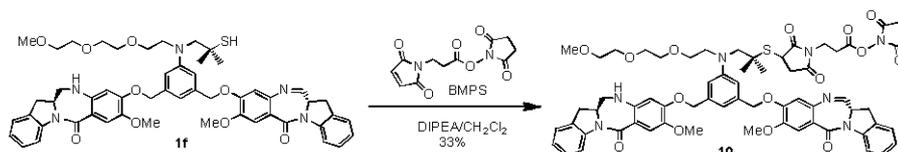
A)	
Dosis(µg/kg)	% Supervivencia
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0



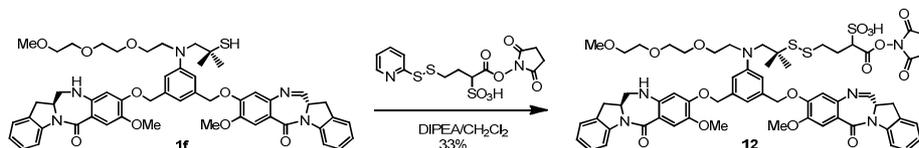
B)		
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
66	100	
132	100	
198	50	
264	25	

C)		
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
120	100	
160	100	
200	100	
320	100	
560	100	

Ejemplo 11

5 **Compuesto 10:**

A una disolución agitada de **1f** (18 mg, 0,019 mmoles) y N-(β-maleimidopropiloxy)succinimida (BMPS) éster (9,2 mg, 0,034 mmoles) en diclorometano anhidro (0,3 ml) se añadió diisopropiletilamina anhidra (5 µl, 0,029 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 27 horas, se paró con cloruro amónico saturado y se diluyó con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, CH₃CN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se extrajeron con diclorometano y se evaporaron para dar el compuesto **10** como un sólido blanco (7,6 mg, y = 33%). MS (m/z): encontrado 1208,3 (M + H)⁺. Ver la FIG. 13.

15 **Ejemplo 12****Compuesto 12:**

A una disolución agitada de **1f** (16,5 mg, 0,018 mmoles) y sulfo-SPDB (14,2 mg, 0,036 mmoles) en diclorometano anhidro (0,3 ml) se añadió diisopropiletilamina anhidra (9 µl, 0,054 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, CH₃CN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se extrajeron con diclorometano y se evaporaron para dar 6,6 mg del compuesto **12** como una espuma amarillenta. La capa acuosa se liofilizó para dar otros 0,5 mg del compuesto **12** como un sólido blanco. MS (m/z): encontrado 1.235,0 (M-H)⁻. Ver la FIG.15.

Ejemplo 13

Preparación del conjugado anticuerpo humanizado-sulfoSPDB-1f

5 Una reacción que contiene 2,5 mg/ml de anticuerpo huMy9-6 y 10 equivalentes molares de **10** (pretratados con exceso de 5 veces de bisulfito sódico en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) pH 8,5 y 15% v/v del cosolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugarse durante 6 horas a 25 °C. Posteriormente a la reacción, el conjugado se purificó y el tampón se intercambió en el tampón de formulación de 250 mM de Glicina, 10 mM de Histidina, 1% de sacarosa, 0,01% de Tween, 50 µM de bisulfito sódico, usando las columnas de desalinización NAP (Ilustra Sephadex G-25 calidad ADN, GE Healthcare). La diálisis se realizó en el mismo tampón durante 4 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO). Se encontró que el conjugado purificado tiene un DAR de 2,4 (por UV-Vis usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30.115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para 1f, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 146.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el anticuerpo My9-6), 96,7% de monómero (por cromatografía de exclusión por tamaño), <1% del compuesto fármaco libre sin conjugarse (por extracción con acetona/fase reversa HPLC) y una concentración final de proteína de 1,4 mg/ml.

La potencia *in vitro* de los conjugados anticuerpo-sulfoSPDB-1f se midió de acuerdo con el procedimiento general descrito en el Ejemplo 7 y los datos se muestran en las Figuras 34 y 35. Los conjugados anticuerpo-sulfoSPDB-1f tienen una potencia comparable o superior que los conjugados anticuerpo-SPDB-1f.

El uso de reactivos de imina covalentes, tales como bisulfito sódico, mejora las especificaciones del conjugado Ab-compuesto (por ejemplo, % monómero y carga del fármaco). En un experimento, la formación del aducto se llevó a cabo con 5 equivalentes molares de reactivo imina sobre NHS-BMPS-1f en 90% DMSO/ 10% PBS pH 7,4 durante 4 h a 25 °C. La mezcla de reacción se añadió después al anticuerpo huMy9-6 (4 equivalentes molares de IGN, 2 mg/ml 10% v/v DMSO, 50 mM de tampón HEPES, pH 8,5, 5 h, 25°C). Los conjugados preparados usando hidrosulfito sódico, bisulfito sódico, o metabisulfito sódico tuvieron relaciones IGN/Ab similares y % de monómero, mientras que los conjugados preparados con el tratamiento sin aditivo condujeron a muy poca incorporación de fármaco. Ver la tabla más abajo.

Reactante	IGN/Ab (UV)	% monómero (SEC)	% 1f en el monómero
Hidrosulfito sódico	2,6	88	82
Bisulfito sódico	2,6	88	83
Metabisulfito sódico	2,7	88	82
Sin aditivo	0,1	98	94

30

Ejemplo 14

Preparación del conjugado anticuerpo humanizado-BMPS-1f

35 Una reacción que contiene 2,0 mg/ml de anticuerpo huMy9-6 y 5 equivalentes molares de **12** (pretratados con exceso de 5 veces de bisulfito sódico en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) pH 8,5 y 15% v/v del codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó reaccionar durante 6 horas a 25 °C. Posteriormente a la reacción, el conjugado se purificó y el tampón se intercambió en el tampón de formulación de 250 mM glicina, 10 mM histidina, 1% sacarosa, 0,01% Tween, 50µM bisulfito sódico, usando las columnas de desalinización NAP (Ilustra Sephadex G-25 calidad ADN, GE Healthcare). La diálisis se realizó en el mismo tampón durante 4 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO). Se encontró que el conjugado purificado tiene un DAR de 2,8 (por UV-Vis usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30.115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para 1f, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 146.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el anticuerpo My9-6), 91,7% de monómero (por cromatografía de exclusión por tamaño), <1% del compuesto fármaco libre sin conjugarse (por extracción con acetona/fase reversa HPLC) y una concentración final de proteína de 1,2 mg/ml.

La potencia *in vitro* de los conjugados anticuerpo-BMPS-1f se midieron de acuerdo con el procedimiento general descrito en el Ejemplo 7 y los datos se muestran en las FIGS. 34 y 35. Los conjugados anticuerpo-BMPS-1f tienen potencia comparable con los conjugados anticuerpo-SPDB-1f.

50

Ejemplo 15

Eficacia *in vivo* del conjugado hu FOLR1-SPDB-1f en ratones desnudos que portan tumor KB:

55

En este estudio, la actividad antitumoral de hu FOLR1-SPDB-1f se investigó en ratones hembra desnudos que portan tumores KB, un modelo de carcinoma cervical humano. 1×10^7 células KB/ratón se inocularon por vía subcutánea en un volumen de 0,1 ml/ratón en el área sobre el hombro derecho de ratones hembra atímicos, de 6

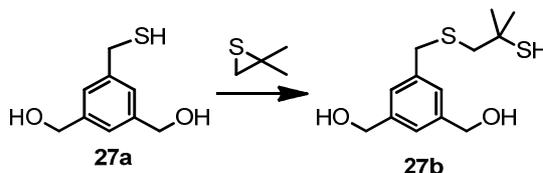
semanas de edad. Seis días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones se aleatorizaron en grupos ($n = 6$ por grupo) por el volumen tumoral. El tratamiento se inició el día después de la aleatorización, y los grupos incluyeron un grupo de control dosificado con PBS (200 μ l/inyección), o un solo tratamiento a diversas dosis (20 a 200 μ g/kg) de hu FOLR1-SPDB-1f (la dosis del fármaco enlazado de 50 μ g/kg correspondió a dosis de anticuerpo de 2,8 mg/kg). Todos los tratamientos se toleraron bien sin pérdida de peso corporal en ninguno de los grupos de prueba. El volumen tumoral medio en función del tiempo se muestra (FIG. 37) con los datos que demuestran una actividad anti-tumoral dependiente de la dosis del conjugado hu FOLR1-SPDB-1f. La dosis mínima efectiva se estimó que era <50 μ g/kg, que es aproximadamente 14 veces inferior que la dosis máxima tolerada.

Se han obtenido resultados *in vivo* similares usando otros conjugados de la invención contra otros diversos modelos de cáncer, que incluyen huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13 (FIG. 50); huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor NB4 (FIG. 51); huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor HL60/QC (FIG. 52); huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13 (FIG. 53); huMy9-6-Fármaco 2 en ratones que portan el tumor HL60/QC (FIG. 56); y huMy9-6-Fármaco 2 en ratones que portan el tumor MOLM-13 (FIG. 57). Obsérvese que en las FIGs. 53, 54, 56, y 57, los conjugados se prepararon en presencia de bisulfito sódico.

Para comparar la eficacia *in vivo* de los conjugados objeto preparados con o sin un grupo reactivo imina, huMy9-6-Fármaco 2 se formularon con o sin 50 μ M de bisulfito sódico, y los conjugados se usaron para tratar ratones que portan xenoinjertos de tumor HL60-QC. Los datos muestran que el conjugado formulado con o sin 50 μ M de bisulfito sódico mostró T/C% comparable a ~ 20 μ g/kg de dosis del fármaco, indicando que la inclusión de bisulfito sódico en la etapa de preparación del conjugado no impacta negativamente en la potencia *in vivo* del conjugado objeto.

NaHSO ₃	Dosis eficaz mínima (μ g/kg fármaco)	T/C %
-	18	20
+	19	16

Ejemplo 16

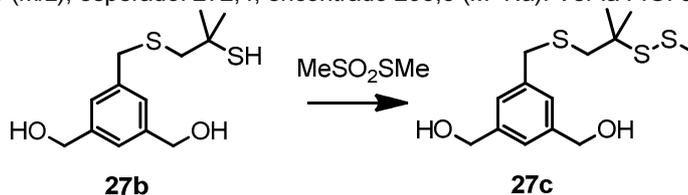


25

Compuesto 27b:

(5-((2-mercapto-2-metilpropil)metil)-1,3-fenileno)dimetanol: (5-(mercaptometil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,163 g, 0,885 mmoles) se disolvió en metanol (3 ml) en un frasco pequeño y se añadió una barra de agitación. A esta disolución se añadió trietilamina (0,016 ml, 0,118 mmoles) seguido por 2,2-dimetiltirano (0,058 ml, 0,590 mmoles) y la mezcla resultante se tapó y se agitó toda la noche (16 h) a temperatura ambiente. La reacción se concentró después, se disolvió nuevamente en diclorometano, se cargó en una placa ptlc de sílice (1.000 micrómetros) y la placa se desarrolló usando 10% metanol en diclorometano. La banda correspondiente al producto se raspó, se filtró con acetato de etilo puro, y se concentró para dar (5-((2-mercapto-2-metilpropil)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,095 g, 0,349 mmoles, 59,1 % de rendimiento). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,26 (s, 3H), 4,69 (s, 4H), 3,82 (s, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,17 (s, 1H), 2,12 (br s, 2H), 1,43 (s, 6H); ¹³C RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 141,6, 138,9, 126,7, 124,3, 65,0, 49,0, 45,4, 38,4, 31,5; MS (m/z), esperado: 272,4, encontrado 295,0 (M+Na). Ver la FIG. 30.

35



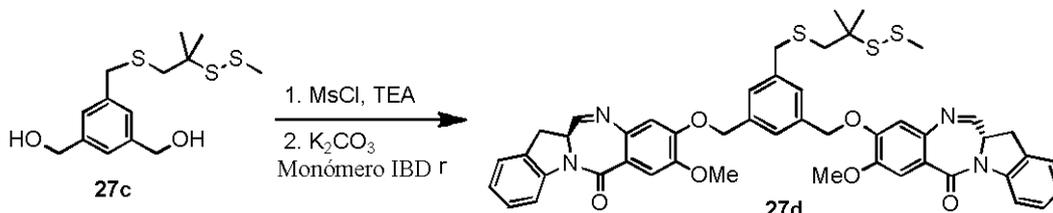
40

Compuesto 27c:

(5-((2-(metildisulfanil)propil)metil)-1,3-fenileno)dimetanol: (5-((2-mercapto-2-metilpropil)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,120 g, 0,440 mmoles) se disolvió en etanol (5 ml) y 1,0 M tampón de potasio fosfato (pH 7) (5,00 ml) y se enfrió en un baño de hielo (se formó un precipitado pero se ignoró). Se añadió S-metil metanosulfonotioato (0,083 ml, 0,881 mmoles) y la mezcla se agitó toda la noche con calentamiento gradual (durante 30 minutos) hasta la temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano y la capa orgánica se retiró, se lavó con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano y se cargó en una placa ptlc de 500 micrómetros y se desarrolló con 66% acetato de etilo en hexano. La banda correspondiente al producto se raspó, se filtró usando acetato de etilo, y se concentró para dar (5-((2-(metil-

50

2-((2-metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (0,091 g, 0,286 mmoles, 64,9 % de rendimiento). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 7,27 (s, 3H), 4,71 (s, 4H), 3,78 (s, 2H), 2,77 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,94 (br s, 2H), 1,38 (s, 6H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 141,6, 139,0, 126,7, 124,2, 65,0, 51,8, 44,0, 38,2, 26,7, 25,3; MS (m/z), esperado: 341,5, encontrado 341,1 (M+Na). Ver la FIG. 30.



5

Compuesto 27d:

(5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)dimetanol (80 mg, 0,251 mmoles) en diclorometano anhidro (1,75 ml) se enfrió hasta -5°C en un baño de salmuera/hielo. Se añadió trietilamina (105 μl , 0,753 mmoles) seguido por la adición de cloruro de metanosulfonilo (50,7 μl , 0,653 mmoles) a -5°C . La reacción se agitó a -5°C durante una hora después de lo cual se diluyó con acetato de etilo frío y se añadió hielo. La mezcla se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo frío. Los extractos orgánicos se lavaron con agua helada y después se secaron con magnesio anhidro y sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)bis(metileno) dimetanosulfonato resultante se usó sin purificación adicional.

10

15

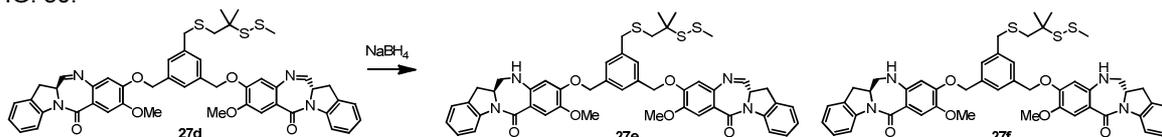
20

25

30

El monómero IBD (177 mg, 0,602 mmoles) en N, N-dimetilformamida anhidra (1,75 ml) se añadió a (5-((2-metil-2-(metildisulfanil)propiltio)metil)-1,3-fenileno)bis(metileno) dimetanosulfonato (119 mg, 0,251 mmoles) a temperatura ambiente. Se añadió carbonato potásico (173 mg, 1,253 mmoles) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción se paró con agua y se extrajo con diclorometano. Los extractos se lavaron con salmuera y después se secaron con sulfato sódico anhidro, se filtraron y se concentraron en alto vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía rápida en gel de sílice (DCM puro \rightarrow 2% MeOH/DCM). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se purificaron por RP-HPLC semi-prep (C18, A=agua DI B=ACN, 20ml/min). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se extrajeron con diclorometano, se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron para producir el producto deseado (46mg, 21%). ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,19 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,77 (m, d, $J = 4,4$ Hz, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,34 (s, 1H), 7,31 (s, 2H), 7,19 (m, 4H), 7,03 (t, $J = 7,2, 7,6$ Hz, 2H), 6,77 (s, 2H), 5,14 (m, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,91 (s, 6H), 3,70 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 2,65 (s, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,26 (s, 6H). MS (m/z), Calcul. 893,2 (M+Na) $^+$; encontrado 893,2 (M + Na) $^+$, 911,2 (M + H_2O + Na) $^+$, 929,2 (M + $2\text{H}_2\text{O}$ + Na) $^+$, 945,1 (M + $2\text{H}_2\text{O}$ + K) $^+$. Ver la FIG. 30.

35

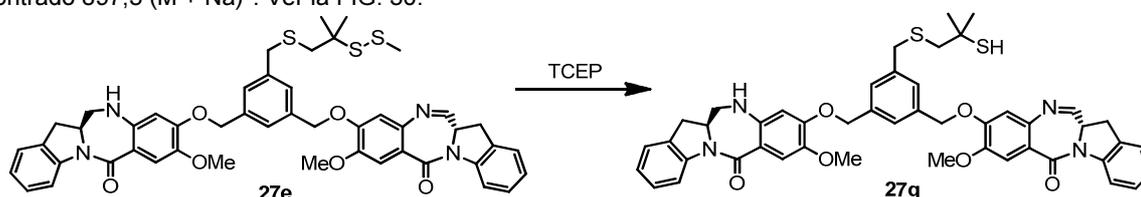


Compuesto 27e y 27f:

A una disolución fría (0°C) de 27d (50 mg, 0,057 mmoles) en diclorometano anhidro (225 μl) y etanol (450 μl) se añadió borohidruro sódico (0,651 mg, 0,017 mmoles). La reacción se agitó durante 5 minutos a 0°C y después a temperatura ambiente durante 2,5 hrs. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C , se paró con cloruro amónico saturado, y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron a través de celita y se concentraron. El material crudo se purificó por RP-HPLC semi-prep (C18, A=agua DI B=ACN, 20ml/min). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, se extrajeron con diclorometano, se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron para producir la amina mono reducida 27e (11mg, 22%) MS (m/z), Calcul. 895,3 (M+Na) $^+$ encontrado 895,2 (M + Na) $^+$, 913,2 (M + H_2O + Na) $^+$, 929,2 (M + H_2O + K) $^+$ y la amina di-reducida 27f (5mg, 10%) MS (m/z), Calcul. 897,3 (M+Na) $^+$, encontrado 897,3 (M + Na) $^+$. Ver la FIG. 30.

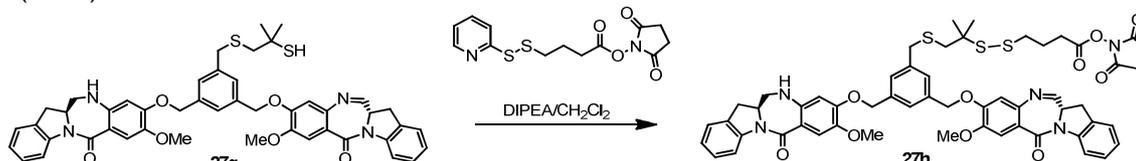
40

45

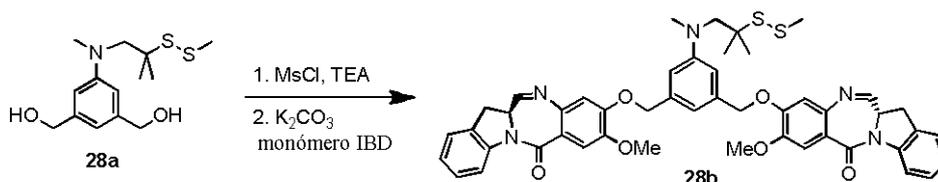


Compuesto 27g:

A una disolución agitada de **27e** (10 mg, 0,011 mmoles) en metanol (733 μ l) y acetonitrilo (880 μ l) se añadió clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (9,85 mg, 0,034 mmoles) en tampón 6,5 (147 μ l). La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano. Se añadió agua y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto **27g** (9mg, 95%). MS (m/z), Calcul. 849,3 (M+Na)⁺; encontrado 849,2 (M + Na)⁺, 867,2 (M + K)⁺. Ver la FIG. 30.

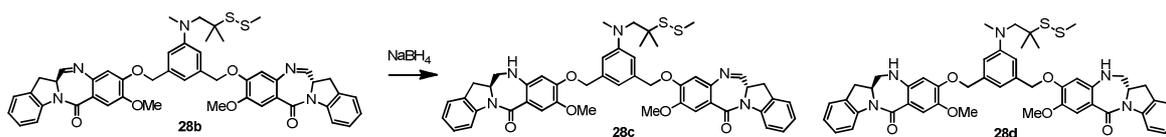
**Compuesto 27h:**

A una disolución agitada de **27g** (9 mg, 10,88 μ moles) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoato (9,3mg, 0,023 mmoles) en diclorometano anhidro (0,4 ml) se añadió diisopropiletilamina anhidra (9 μ l, 0,054 mmoles) y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se paró con disolución de cloruro amónico saturado y se extrajo con diclorometano. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (columna C18, CH₃CN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se extrajeron con diclorometano y se evaporaron para dar el compuesto **27h** (5mg, 44%). MS (m/z), Calcul. 1064,3 (M + Na)⁺; encontrado 1064,1 (M + Na)⁺, 1082,1 (M + H₂O + Na)⁺, 1098,1 (M + H₂O + K)⁺. Ver la FIG. 30.

Ejemplo 17**Compuesto 28b:**

(5-(metil(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (52 mg, 0,172 mmoles) se disolvió en diclorometano anhidro (1,7 ml) y se enfrió hasta -5 en un baño de acetona/hielo. Primero, se añadió trietilamina (0,120 ml, 0,862 mmoles) seguido por cloruro de metanosulfonilo (0,040 ml, 0,517 mmoles). La mezcla se agitó en el baño durante 1 hora. La reacción se diluyó después con acetato de etilo frío y se lavó con agua fría tres veces y después se secó sobre sulfato magnésico anhidro. El dimesilato se filtró, se concentró al vacío, y se colocó bajo alto vacío hasta que se secó completamente. El producto se usó como estaba directamente en la próxima etapa.

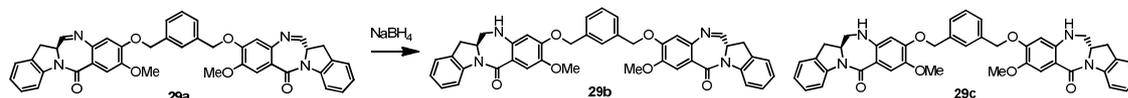
El monómero IBD (115 mg, 0,39 mmoles) en N,N-dimetilformamida anhidra (1,5 ml) se añadió a (5-(metil(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)bis(metileno) dimetanosulfonato (72 mg, 0,156 mmoles) a temperatura ambiente. Se añadió carbonato potásico (108 mg, 0,780 mmoles) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se añadió agua (10ml) directamente a la mezcla con agitación resultando en la formación de un precipitado blanco. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron con porciones adicionales de agua. El sólido se disolvió después en diclorometano, se extrajo con agua, la capa orgánica se secó después sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró al vacío para dar el compuesto **28b** (104 mg, 78%) que se usó en la siguiente etapa sin tratamiento adicional. MS (m/z), encontrado 912,1 (M + 2H₂O + Na). Ver la FIG. 31.

**Compuesto 28c y 28d:**

El Compuesto **28b** (55 mg, 0,064 mmoles) se disolvió en una mezcla anhidra de diclorometano (0,4ml) y etanol (0,8 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Una disolución de borohidruro sódico (0,731 mg, 0,019 mmoles) disuelta en etanol (100 μ l) se añadió después y la mezcla se agitó durante 5 minutos y el baño de hielo se retiró. La reacción se dejó agitar durante 2 horas, se paró a baja temperatura mediante la adición de cloruro amónico saturado

y diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró al vacío. El residuo se purificó por RP-HPLC semi-prep (C18, A=agua DI B=ACN, 20ml/min). Las fracciones que contenían los productos deseados se extrajeron con diclorometano y se concentraron para dar la mono-imina **28c** (19 mg, 32%) MS (m/z), esperado: 855,1, encontrado: 896,2 (M + H₂O + Na) y la amina di-reducida **28d** (22 mg, 38%) MS (m/z), esperado: 857,1, encontrado: 880,2 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 31.

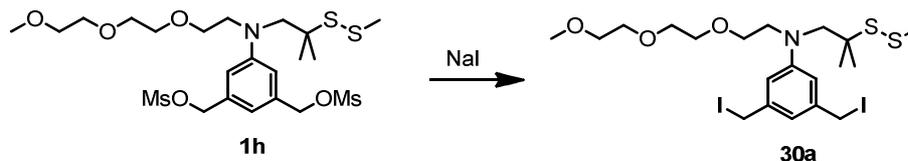
Ejemplo 18



Compuesto **29b** y **29c**:

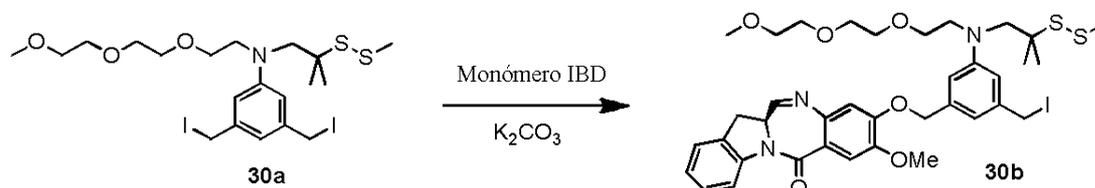
El Compuesto **29a** (60 mg, 0,043 mmoles) se disolvió en una mezcla anhidra de diclorometano (0,25ml) y etanol (0,5 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. Una disolución de borohidruro sódico (0,493 mg, 0,013 mmoles) disuelta en etanol (50 µl) se añadió después y la mezcla se agitó durante 5 minutos y el baño de hielo se retiró. La reacción se dejó agitar durante 3 horas, se paró a baja temperatura mediante la adición de cloruro amónico saturado y diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró al vacío. El residuo se purificó por RP-HPLC semi-prep (C18, A=agua DI B=ACN, 20ml/min). Las fracciones que contenían los productos deseados se extrajeron con diclorometano y se concentraron para dar la mono-imina **29b** (20 mg, 33%) MS (m/z), esperado: 715,7, encontrado: 715,2 (M + Na)⁺, 733,2 (M + H₂O + Na)⁺, 749,2 (M + H₂O + K)⁺ y la amina di-reducida **29c** (12 mg, 20%) MS (m/z), esperado: 694,7, encontrado: 717,2 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 32.

Ejemplo 19



Compuesto **30a**:

(5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno) bis(metileno) dimetanosulfonato (0,566 g, 0,960 mmoles) se disolvió en acetona (30 ml) y una disolución de yoduro sódico (0,544 g, 3,63 mmoles) disuelta en acetona (2 ml) se añadió con agitación vigorosa. La reacción se monitorizó por tlc (50% acetato de etilo en hexano) y después de 2 horas la reacción se filtró, se concentró al vacío y se añadió diclorometano al residuo. La sal sólida que quedó atrás se filtró, el filtrado se concentró y el residuo resultante se purificó en gel de sílice usando una mezcla 3:5:2 de acetato de etilo:hexano:diclorometano para dar 3,5-bis(yodometil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (0,505 g, 0,773 mmol, 74,5 % de rendimiento) como un aceite amarillo. ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 6,75 (s, 2H), 6,73 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 3,63 (m, 14H), 3,40 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 1,38 (s, 6H); ¹³C RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 148,7, 140,3, 117,3, 113,4, 71,9, 70,7, 70,6, 67,2, 59,8, 59,1, 53,5, 53,4, 51,8, 26,5, 25,6, 6,11; MS (m/z), Calcul. 676,0 (M + Na)⁺; encontrado 675,8 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 33.



Compuesto **30b**:

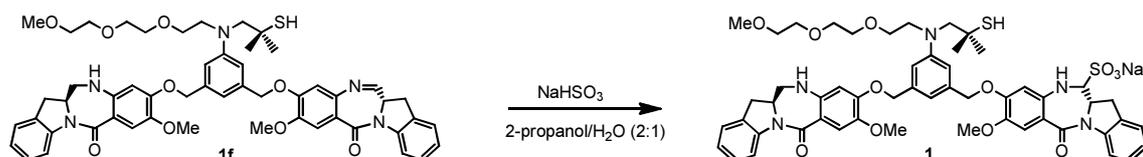
El monómero IBD (0,060 g, 0,204 mmoles) se disolvió en acetona (4 ml) en un frasco pequeño, se añadió una barra de agitación, seguido por 3,5-bis(yodometil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (0,167 g, 0,255 mmoles) y carbonato potásico (0,070 g, 0,510 mmoles). El frasco se tapó y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en diclorometano, se extrajo con agua, y la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró al vacío para dar 108 mg del material crudo. El material crudo se purificó en gel de sílice usando 30% acetato de etilo para eliminar el material de partida de di-yodo seguido por 10% metanol en diclorometano para dar el producto deseado **30b** (21 mg, 0,026 mmoles, 13%). MS (m/z), esperado: 819,1, encontrado: 858,0 (M + K)⁺,

890,0 (M + CH₃OH + K)⁺. Ver la FIG. 33.

Compuesto 1d:

5 El monómero reducido **3b** (4,16 mg, 0,014 mmoles) se disolvió en acetona (2 ml) en un frasco pequeño, se añadió una barra de agitación, seguido por **30b** (10 mg, 0,012 mmoles) y carbonato potásico (4,21 mg, 0,030 mmoles). El frasco se tapó y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se concentró para eliminar la acetona y después se disolvió nuevamente en diclorometano, se extrajo con agua, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC C18 de fase reversa para obtener **1d** (2,1 mg, 2,125 μmoles, 17,42 % de rendimiento). MS (m/z): encontrado 1010,4 (M + Na)⁺, 1028,4 (M + H₂O + Na)⁺. Ver la FIG. 33.

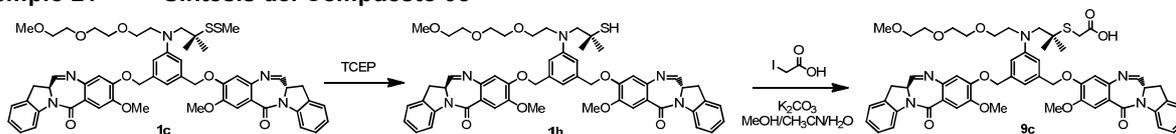
Ejemplo 20 Síntesis del Compuesto 1



15 **Compuesto 1:**

A una suspensión agitada de **1f** (226 mg, 0,24 mmoles) en IPA (20 ml) y agua desionizada (10 ml) se añadió bisulfito sódico (50 mg, 0,48 mmoles). La mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 horas. Se congeló con hielo seco/acetona y se liofilizaron. El sólido esponjoso blanco obtenido se disolvió en CH₃CN/H₂O y se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, CH₃CN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se congelaron con hielo seco/acetona y se liofilizaron para dar el compuesto deseado **1** como un sólido esponjoso blanco (179,6 mg, 5 = 71,6%). MS (m/z): encontrado 1022,0 (M - H)⁻. Ver la FIG. 38.

Ejemplo 21 Síntesis del Compuesto 9c



30 **Compuesto 9c:**

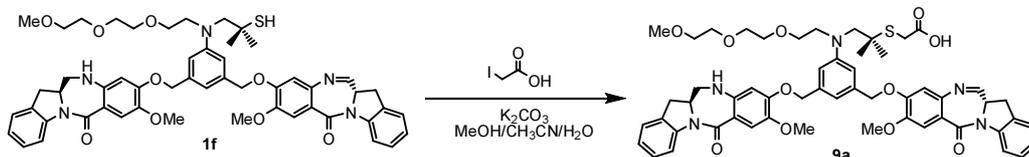
A una solución agitada de **1c** (60 mg, 0,061 mmoles) en CH₃CN (3 ml) se añadió disolución TCEP recientemente preparada (49 mg, 0,17 mmoles de sal HCl de TCEP se neutralizó con bicarbonato sódico saturado a pH ~6,5 y después se diluyó con 0,5 ml de tampón fosfato pH 6,5) a temperatura ambiente. Se añadió MeOH (2,5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y agua desionizada, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtró. El filtrado se limpió y se sometió a alto vacío para dar 60 mg de **1h** como una espuma amarillenta clara. MS (m/z): encontrado 940,1 (M + H)⁺. Ésta se disolvió en metanol (1,0 ml) y CH₃CN (1,4 ml) seguido por la adición de ácido yodoacético (24 mg, 0,13 mmoles), agua desionizada (0,1 ml) y carbonato potásico (27 mg, 0,19 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche (monitorizada por LCMS). Ésta se paró con cloruro amónico saturado para preparar la solución ácida, después se diluyó con diclorometano, se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se limpió para dar el compuesto **9c** (57,8 mg, y = 91%) el cual se usó directamente en la próxima etapa sin purificación adicional. MS (m/z): encontrado 998,1 (M + H)⁺. Ver la FIG. 12A.

45 **Compuesto 9a:**

A una solución agitada del compuesto **9c** (57,8 mg, 0,058 mmoles) en diclorometano anhidro (0,2 ml) y etanol absoluto (0,6 ml) se añadió NaBH₄ (2,5 mg, 0,066 mmoles) a 0 °C. El baño de hielo se eliminó y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 horas y después se apagó con cloruro amónico saturado, se diluyó con diclorometano,

se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró a través de celita y se limpió. El residuo se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Las fracciones del producto se extrajeron con diclorometano y se limpiaron para dar el compuesto **9a** (13,0 mg, $y = 22\%$). MS (m/z): encontrado 1000,0 ($M + H$)⁺, 1015,9 ($M + \text{H}_2\text{O} - H$)⁻. Ver la FIG. 12A.

5

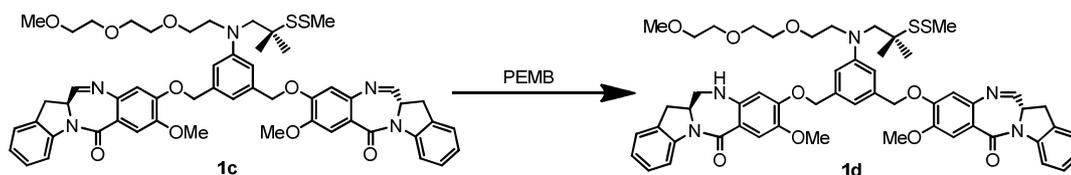


Compuesto 9a:

10 A una disolución de tiol libre **1f** (45 mg, 0,048 mmoles) y ácido yodoacético (18 mg, 0,096 mmoles) en metanol (1,0 ml) y CH_3CN (1,4 ml) se añadió agua desionizada (0,1 ml) y carbonato potásico (20 mg, 0,14 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche (monitorizada por LCMS). Ésta se apagó con cloruro amónico saturado para preparar la disolución ácida, después se diluyó con diclorometano, se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se limpió. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Las fracciones del producto puro (basado en MS) se extrajeron con diclorometano, se limpiaron para dar el ácido deseado **9a** (18 mg, $y = 38\%$). MS (m/z): encontrado 1.000,1 ($M + H$)⁺. Ver la FIG. 12B.

15

Ejemplo 22 Síntesis del Compuesto 1d

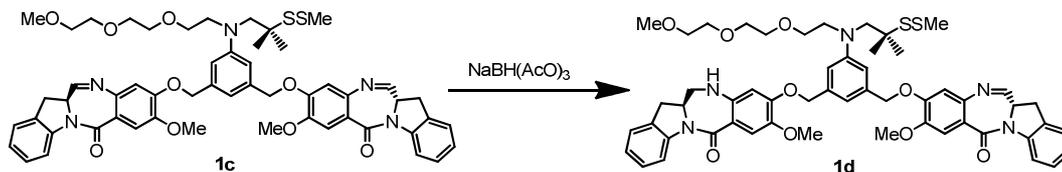


20

Compuesto 1d:

25 A una disolución agitada del compuesto **1c** (178 mg, 0,18 mmoles) en diclorometano anhidro (1,2 ml) y etanol absoluto o metanol anhidro (0,1 ml) se añadió 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB, 0,017 ml, 0,11 mmoles) en forma de gotas. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se paró con 88% ácido fórmico. Ésta se basificó con NaHCO_3 saturado y se diluyó con diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró a través de celita y se limpió. El residuo se disolvió en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}$ (5:1:0,05) y se purificó por HPLC de fase reversa (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Las fracciones que contenían el producto puro se extrajeron con diclorometano y se limpiaron para dar el compuesto **1d** (56 mg, $y = 31\%$). MS (m/z): encontrado 988,1 ($M + H$)⁺. Ver la FIG. 39.

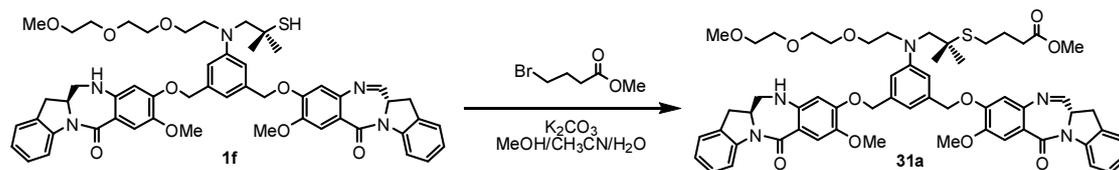
30



35 **Compuesto 1d:**

40 A una disolución agitada del compuesto **1c** (71 mg, 0,072 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (0,8 ml) se añadió triacetoxiborohidruro sódico (14 mg, 0,65 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se apagó con NaHCO_3 saturado y se diluyó con diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró a través de celita y se limpió. El residuo se disolvió en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/88\% \text{HCOOH}$ (5:1:0,05) y se purificó por HPLC de fase reversa (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). Las fracciones que contenían el producto puro se extrajeron con diclorometano y se limpiaron para dar el compuesto **1d** (17 mg, $y = 24\%$). MS (m/z): encontrado 988,1 ($M + H$)⁺. Además se recogió el material de partida sin reaccionar **1c** (24 mg, $y = 34\%$). Ver la FIG. 40.

45

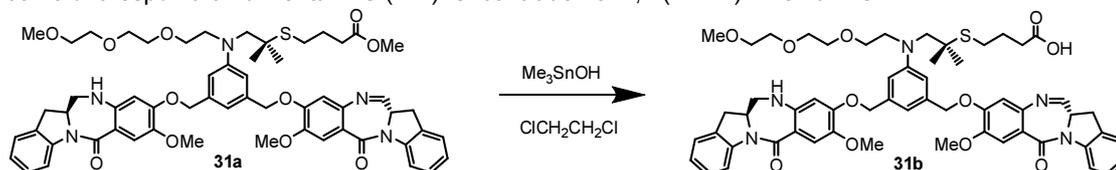
Ejemplo 23 Síntesis del Compuesto 31c

5

Compuesto 31a:

A una disolución del compuesto **1f** (57,8 mg, 0,061 mmoles) y metil 4-bromobutirato (22 mg, 0,12 mmoles) en metanol (1,0 ml) y CH₃CN (1,0 ml) se añadió agua desionizada (0,1 ml) y carbonato potásico (17 mg, 0,12 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche, después se paró con cloruro amónico saturado y se diluyó con diclorometano, se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se limpió. El residuo se purificó por HPLC preparativa de fase reversa (C18, CH₃CN/H₂O) para dar el producto deseado **31a** (14 mg, y = 22%) como una espuma amarillenta. MS (m/z): encontrado 1042,1 (M + H)⁺. Ver la FIG. 41.

10

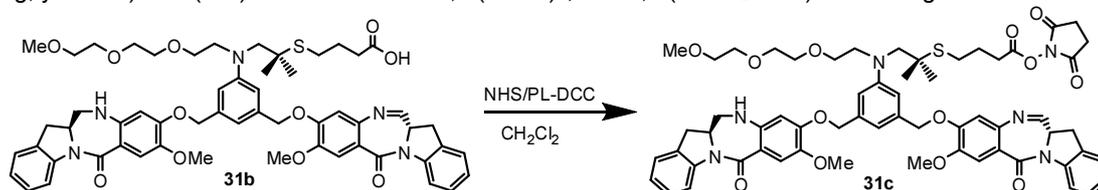


15

Compuesto 31b:

A una disolución del éster de metilo **31a** (14 mg, 0,013 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (1,5 ml) se añadió hidróxido de trimetilestano (36 mg, 0,2 mmoles). La mezcla se agitó toda la noche en un baño de aceite a 80 °C hasta que se consumió completamente el material de partida. Ésta se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano, se lavó con salmuera/gotas 5% HCl y salmuera, se secó y se filtró. El filtrado se limpió y se purificó con cromatografía en gel de sílice (diclorometano/MeOH) para dar el ácido **31b** como un sólido amarillento (10,2 mg, y = 74%). MS (m/z): encontrado 1.028,2 (M + H)⁺, 1.044,1 (M + H₂O - H)⁻. Ver la Figura 41.

20

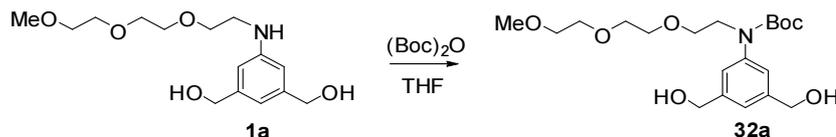


25

Compuesto 31c:

A una disolución del ácido **31b** (10,2 mg, 0,0099 mmoles) en diclorometano anhidro (0,5 ml) se añadió N-hidroxisuccinimida (3,4 mg, 0,03 mmoles) y PL-DCC (26 mg, 0,04 mmoles, 1,55 mmoles/g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche y se filtró para eliminar la resina. La resina se lavó con diclorometano, después acetato de etilo. El filtrado se limpió y el residuo se purificó por HPLC de fase reversa (C18, CH₃CN/H₂O). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para dar NHS éster **31c** como un sólido blanco (3,6 mg, y = 32%). MS (m/z): encontrado 1.125,1 (M + H)⁺. Ver la FIG. 41.

30

Ejemplo 24 Síntesis del Compuesto 32c

35

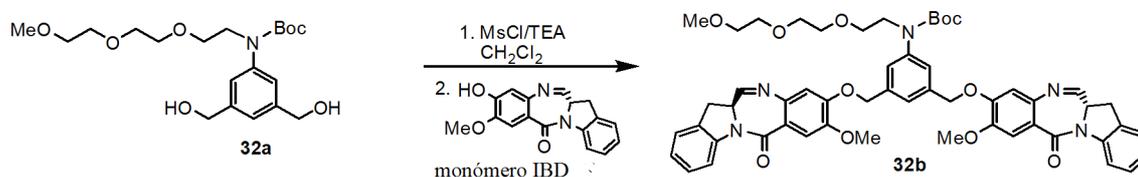
Compuesto 32a:

A una disolución agitada de la anilina **1a** (339 mg, 1,1 mmoles) en tetrahydrofurano anhidro (4,0 ml) se añadió Boc anhídrido (272 mg, 1,2 mmoles). La mezcla continuó agitándose a temperatura ambiente durante tres días. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH) para dar el compuesto **32a** (405 mg, y = 90%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,00 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 4,12 (s, 2H), 3,64 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,48-3,44 (m, 8H), 3,40-3,38 (m, 2H),

40

45

3,21 (s, 3H), 1,31 (s, 9H); ^{13}C RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 154,65, 142,3, 142,1, 124,1, 122,7, 80,2, 71,6, 70,3, 70,1, 69,9, 68,5, 63,9, 58,65, 49,4, 28,1. Ver la FIG. 42.



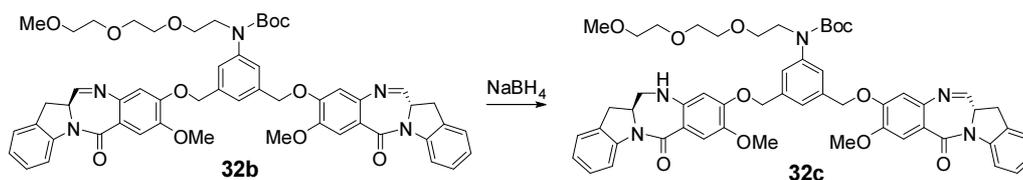
5

Compuesto **32b**:

A una disolución agitada del compuesto **32a** (51 mg, 0,128 mmoles) en diclorometano anhidro se añadió trietilamina (0,053 ml, 0,383 mmoles) a $-5\sim-10$ °C. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,026 ml, 0,332 mmoles) después lentamente en 15 minutos con una jeringa. La mezcla se agitó a $-5-10$ °C durante 1 hora (TLC, DCM/MeOH 10:1). La reacción se paró con hielo/agua, se diluyó con AcOEt frío, se separó y la capa orgánica se lavó con agua fría, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro/ MgSO_4 , se filtró y se limpió. El residuo se transfirió a un frasco de reacción pequeño con diclorometano, se limpió y se sometió a alto vacío. Éste se disolvió en DMF anhidro (0,8 ml) seguido por la adición del monómero IBD (90 mg, 0,31 mmoles) y potasio (53 mg, 0,38 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se diluyó con diclorometano, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se limpió. El residuo se purificó por HPLC de fase reversa (C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$) para dar el compuesto **32b** (56 mg, 46%) como un sólido amarillento. ^1H RMN (400 Hz, CDCl_3): δ 8,29 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,87 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H), 7,60 (s, 2H), 7,38-7,36 (m, 3H), 7,33-7,27 (m, 4H), 7,13 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 6,88 (s, 2H), 5,21 (dd, $J_1 = 20,0$ Hz, $J_2 = 12,4$ Hz, 4H), 4,49 (dt, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,83 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 3,76-3,48 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 1,43 (s, 9H); MS (m/z): encontrado 992,2 ($\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$, 1.010,2 ($\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$) $^+$. Ver la FIG. 42.

15

20



Compuesto **32c**:

A una disolución agitada del compuesto **32b** (56 mg, 0,059 mmoles) en diclorometano anhidro (0,3 ml) y etanol absoluto (0,9 ml) se añadió NaBH_4 (2,7 mg, 0,07 mmoles) a 0 °C. El baño de hielo se retiró y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se paró con cloruro amónico saturado, se diluyó con diclorometano, se separó y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró a través de celita y se limpió. El residuo se purificó por HPLC de fase reversa (columna C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$). El material de partida recuperado **32b** pesó 12 mg el cual se sometió nuevamente a las condiciones de reducción y se purificó por HPLC de fase reversa. Todas las fracciones que contenían el producto puro se extrajeron con diclorometano y se limpiaron para dar el compuesto **32c** (20,7 mg, $y = 37\%$) como un sólido amarillento claro. MS (m/z): encontrado 954,2 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Ver la FIG. 42.

30

35

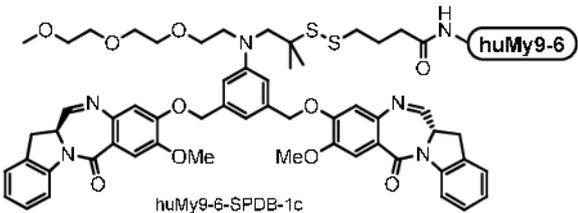
Ejemplo 25

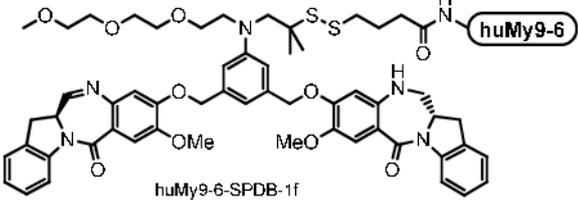
La tolerabilidad de los conjugados huMy9-6 se investigó en ratones hembra CD-1. Los animales se observaron siete días antes del inicio del estudio y se encontró que carecían de enfermedades o afecciones. A los ratones se le administró una única inyección *i.v.* del conjugado y los animales se monitorizaron diariamente para la pérdida de peso corporal, morbilidad o mortalidad. La Tabla 10 muestra que el huMy9-6-SPDB-1c di-imina disulfuro que contiene el conjugado se toleró a una dosis de menos de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por el contrario, se encontró que los conjugados mono-imina disulfuro huMy9-6-SPDB-1f y huMy9-6-sulfo-SPDB-1f eran mejor tolerados con una dosis máxima tolerada de >729 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y <750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente.

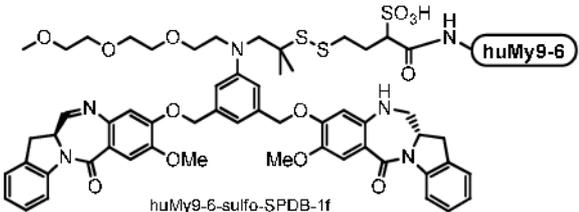
40

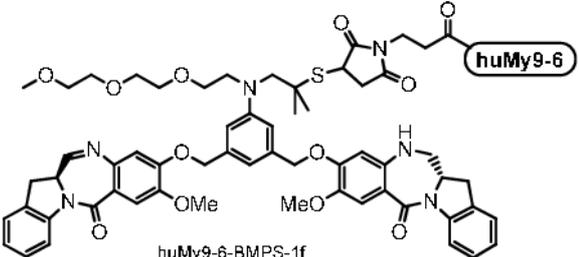
45

Tabla 10. Datos de comparación de tolerabilidad de los conjugados (A) huMy9-6-SPDB-1c, (B) huMy9-6-SPDB-1f, (C) huMy9-6-sulfo-SPDB-1f, y (D) huMy9-6-BMPS-1f.

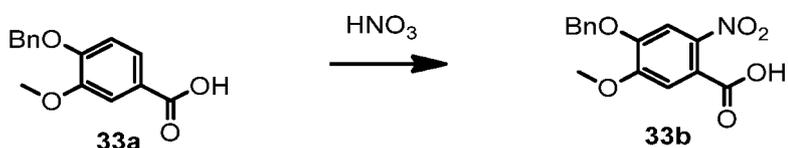
A)		 <p>huMy9-6-SPDB-1c MTD < 300 µg/kg</p>
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
100	100	
300	50	
500	0	
700	0	

B)		 <p>huMy9-6-SPDB-1f MTD > 729 µg/kg</p>
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
405	100	
567	100	
729	100	

C)		 <p>huMy9-6-sulfo-SPDB-1f MTD < 750 µg/kg</p>
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
450	100	
600	100	
750	88	
900	50	

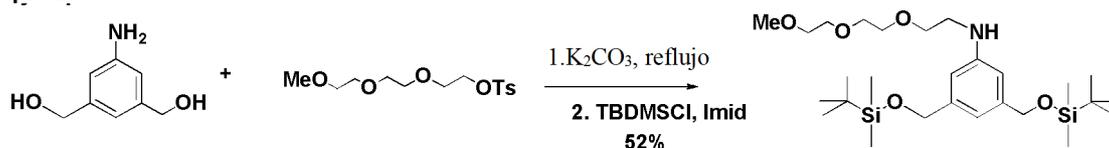
D)		 <p>huMy9-6-BMPS-1f MTD < 324 µg/kg</p>
Dosis (µg/kg)	% Supervivencia	
100	100	
200	100	
284	100	
324	83	
405	50	

Ejemplo 26

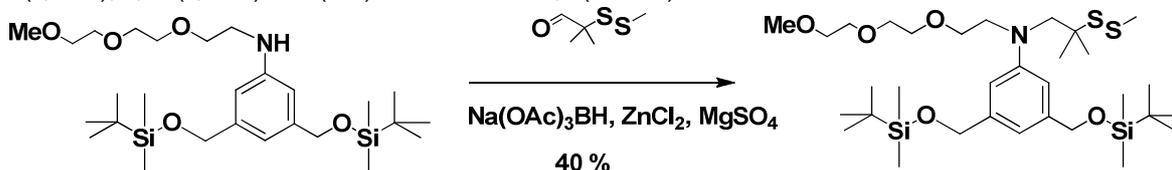


Compuesto 33b:

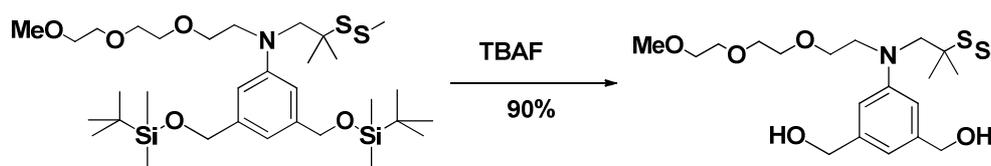
El Compuesto **33a** (20g, 77 mmoles) se añadió como una suspensión espesa en diclorometano anhidro (100 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió ácido acético (191ml), resultando en una solución clara la cual se agitó a 0 °C hasta que se enfría. Se añadió ácido nítrico (26ml, 581 mmoles) lentamente en forma de gotas a través de un embudo de adición. El baño de hielo se retiró y la disolución continuó agitándose a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la reacción se diluyó con agua desionizada y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y el filtrado se concentró al vacío. El residuo crudo se recrystalizó usando acetato de etilo y hexanos. El sólido se filtró y se lavó con hexanos para dar el compuesto **33b** como un sólido esponjoso amarillo (13,8g, y = 59%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 7,48-7,43 (m, 6H), 7,25 (s, 1H), 5,25 (s, 2H), 4,02 (s, 3H), MS (m/z): 326,1 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 45.

Ejemplo 27**3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)anilina:**

Una mezcla de (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (11,78 g, 77 mmoles), 2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil 4-metilbenzenosulfonato (15,3 g, 48,1 mmoles), y carbonato potásico (13,28 g, 96 mmoles) en DMF (96 ml) se sometió a reflujo durante 20 horas. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó con diclorometano. La mezcla se filtró a través de celita y se concentró *al vacío*. El aceite naranja resultante se disolvió en diclorometano (240 ml) y se añadieron cloruro de *t*-butildimetilsililo (18,09 g, 120 mmoles) e imidazol (9,80 g, 144 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas después de lo cual se diluyó con diclorometano y se filtró a través de celita. La purificación por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hex) produjo 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)anilina (13g, 52%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 6,52 (s, 1H), 6,40 (s, 2H), 4,56 (s, 4H), 3,60 (t, 2H, J = 5,2 Hz), 3,56 (m, 6H), 3,46 (m, 2H), 3,29 (s, 3H), 3,20 (t, 2H, J = 5,2 Hz), 0,84 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). MS (m/z): encontrado 550,1 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 46.

**3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina:**

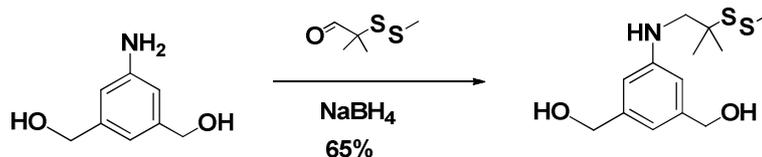
A una disolución de 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)anilina (6,7 g, 12,69 mmoles) en 1,2-dicloroetano anhidro (50 ml) se añadió 2-(metilditio)isobutiraldehído (2,74 ml, 19,04 mmoles), triacetoxiborohidruro sódico (2,8g, 1eq), cloruro de zinc(II) (0,865 g, 6,35 mmoles) y sulfato magnésico (2,292 g, 19,04 mmoles). La mezcla se agitó durante cinco horas a temperatura ambiente. Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (2,8g, 1eq). La reacción continuó agitándose a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se filtró a través de celita enjuagándose con diclorometano y se concentró a presión reducida, después se extrajo con acetato de etilo y agua. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron, se concentraron y se purificaron por combiflash (EtOAc/Hex) para dar 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (3,5g, 40%). ¹H RMN (400 Hz, CDCl₃): δ 6,73 (s, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,56 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,30 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,28 (s, 6H), 0,84 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). MS (m/z): encontrado 684,2 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 46.

**(5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (1b):**

Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1M en THF) (10,57 ml, 10,57 mmoles) en forma de gotas a la disolución agitada de 3,5-bis(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-N-(2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)anilina (3,5 g, 5,29 mmoles) en THF anhidro (65 ml) a 0 °C en un baño de hielo. Después de la

adición la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se paró con cloruro amónico saturado y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos se lavaron con agua y salmuera, se secaron con sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía en gel de sílice (MeOH/DCM) produjo (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (2g, 87%). $^1\text{H RMN}$ (400 Hz, CDCl_3): δ 6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); $^{13}\text{C RMN}$ (400 Hz, CDCl_3): δ 149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z): encontrado 456,2 (M + Na)⁺. Ver la FIG. 46.

10 Ejemplo 28

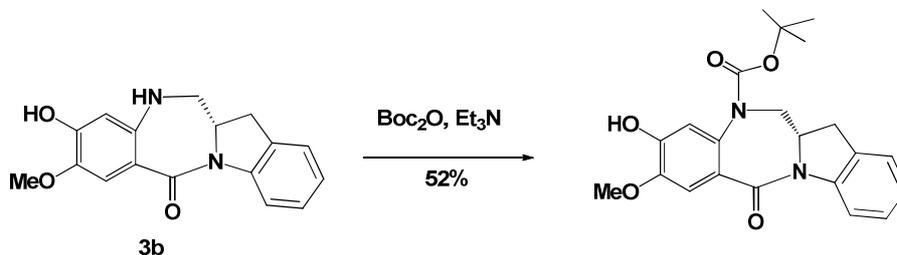


(5-(2-metil-2-(metildisulfanil)propilamino)-1,3-fenileno)dimetanol:

15 Se agitaron (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,5 g, 16,32 mmoles) y 2-(metilditio)isobutiraldehído (2,347 ml, 16,32 mmoles) a temperatura ambiente en etanol absoluto (82 ml) hasta que se disolvieron completamente (3 horas). La mezcla se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y se añadió borohidruro sódico (0,741 g, 19,59 mmoles). La reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C, y después se paró lentamente con disolución al 5% de HCl fría. La mezcla se diluyó con diclorometano y el pH se ajustó a pH=8 con disolución de bicarbonato sódico saturado, después se extrajo con diclorometano y después se lavó con salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico anhidro, se filtraron, y se concentraron a presión reducida. La purificación por cromatografía en gel de sílice (MeOH/DCM) produjo (5-(2-metil-2-(metildisulfanil)propilamino)-1,3-fenileno)dimetanol (3g, 65%) como un sólido blanco.

20 $^1\text{H RMN}$ (400 Hz, CDCl_3): δ 6,62 (s, 1H), 6,54 (s, 2H), 4,53 (s, 4H), 3,13 (s, 2H), 2,30 (s, 3H), 1,32 (s, 6H). Ver la FIG. 47.

Ejemplo 29

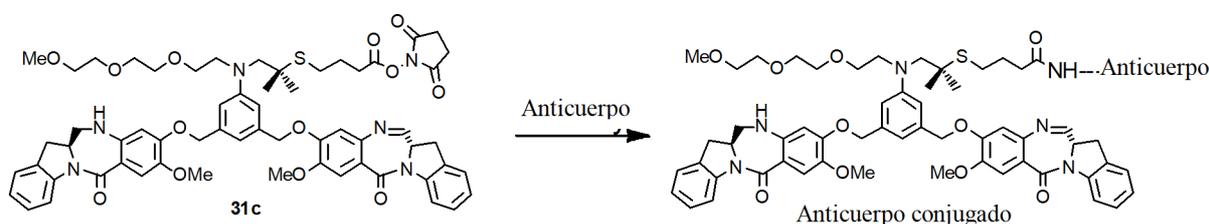


30 *terc-butil 9-hidroxi-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-11(12H)-carboxilato:*

A una disolución de 9-hidroxi-8-metoxi-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-6-ona **3b** (0,3 g, 1,012 mmoles) en metanol (5,06 ml) se añadieron di-*terc*-butil dicarbonato (0,265 g, 1,215 mmoles), trietilamina (0,212 ml, 1,519 mmoles) y DMAP (6,18 mg, 0,051 mmoles). Después de 5 horas de agitación a temperatura ambiente la mezcla de reacción se concentró *al vacío*. El residuo se disolvió nuevamente en diclorometano y se filtró a través de celita. La purificación por cromatografía en gel de sílice (20% EtOAc/DCM) produjo *terc*-butil 9-hidroxi-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-11(12H)-carboxilato (0,21g, 52%) como un sólido blanco. $^1\text{H RMN}$ (400 Hz, CDCl_3): δ 8,25 (d, J = 8,0Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,18 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 7,2Hz, 1H), 6,98 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 4,37 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,42 (m, 3H), 2,74 (dd, J = 3,6, 16,4 Hz, 1H), 1,47 (s, 9H). Ver la FIG. 48.

Ejemplo 30

Preparación y prueba de huMy9-6-31c



Una reacción que contiene 2,0 mg/ml del anticuerpo huMy9-6 y 5 equivalentes molares del compuesto **31c** (pretratados con exceso de 5 veces de bisulfito sódico en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) pH 8,5 y 10% v/v del codisolvente DMA (*N,N*-Dimetilacetamida) se dejó conjugarse por 6 horas a 25 °C. Posteriormente a la reacción, el conjugado se purificó y el tampón se intercambió en el tampón de formulación de 250 mM glicina, 10 mM histidina, 1% sacarosa, 0,01% Tween-20, 50µM bisulfito sódico, pH 6,2, usando las columnas de desalinización NAP (Illustra Sephadex G-25 calidad ADN, GE Healthcare). La diálisis se realizó en el mismo tampón durante 4 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tiene un promedio de 3,1 moléculas de IGN enlazadas por anticuerpo (por UV-Vis usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30.115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para **1**, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207.000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el anticuerpo My9-6), 98% de monómero (por cromatografía de exclusión por tamaño), <0,2% del fármaco sin conjugarse (por análisis HPLC de doble columna en fase reversa) y una concentración final de proteína de 0,4 mg/ml.

Las mediciones de la potencia *in vitro* para los conjugados de huMy9-6 con **31c** a dos cargas diferentes del fármaco se muestran más abajo. Ambos conjugados fueron altamente potentes hacia las células HL60-QC positivas al antígeno, con valores CI_{50} entre 1,3-1,8 µM. El bloqueo del antígeno con 1 µM de huMy9-6 sin conjugarse disminuyó significativamente la potencia, demostrando la especificidad de antígeno del efecto citotóxico.

Conjugado huMy9-6- 31c	CI_{50} (µM)	CI_{50} (µM) huMy9-6 de bloqueo	Ventana de especificidad
3,1 IGN/Ab	1,8	940	522
3,9 IGN/Ab	1,3	790	608

Ejemplo 31

La eficacia in vivo de diversos conjugados en ratones desnudos que portan tumor

En este estudio, la actividad anti-tumoral de varios conjugados de la invención se investigan en ratones inmunocomprometidos (desnudos o SCID), preferentemente ratones hembra desnudos, que portan diversos tumores. En algunos casos, se pueden emplear adicionalmente o como una alternativa, ratas desnudas. Los conjugados que se prueban incluyen cualquiera o más de los conjugados descritos en la presente. Las diversas líneas de células tumorales que pueden usarse para la inoculación de los ratones desnudos incluyen HL60/QC, MOLM-13, NB4, HEL92.1.7, OCI-AML3, KB, y/o cualquier otra línea celular de cáncer reconocida en la técnica como un modelo adecuado para la indicación de la enfermedad (*por ejemplo*, cáncer). Algunos criterios que se pueden aplicar para la selección de las líneas celulares tumorales adecuadas para la evaluación *in vivo* incluyen: a) expresión del antígeno diana en la célula tumoral y, b) sensibilidad de las células tumorales *in vitro* al fármaco sin conjugarse. Por ejemplo, un cribado de la sensibilidad de la línea celular *in vitro*, tal como el cribado de la línea celular 60 descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (ver Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, Clinical Cancer Res. 9; 42227-4239) puede usarse como una de las guías para determinar los tipos de cánceres que pueden ser adecuados para el tratamiento con los compuestos de la invención. La potencia de los diversos conjugados contra las diversas líneas celulares tumorales, se mide por consiguiente como se expresó por los valores CI_{50} (nM),

Las diversas líneas de células tumorales se inoculan a ratones desnudos o SCID usando sustancialmente el mismo protocolo como se definió en el Ejemplo 15. Por ejemplo, aproximadamente $1 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ células tumorales (típicamente 1×10^7) células/ratón se inocularon por vía subcutánea a un volumen de aproximadamente 0,1-0,2 ml/ratón, en el área sobre el hombro derecho de ratones hembra desnudos atímicos, de 6 semanas de edad. Cuando el tumor ha alcanzado un tamaño promedio de $\sim 100\text{ mm}^3$ (típicamente 6 a 8 días después de la inoculación de células tumorales), los ratones se aleatorizan en grupos (*por ejemplo*, $n = 5 - 8$ por grupo) por volumen tumoral. El tratamiento se inicia el día después de la aleatorización, y los grupos incluyen un grupo control dosificado con el vehículo adecuado (200 µl/ inyección) , o un solo tratamiento a diversas dosis (5 a 700 µg/kg) de los conjugados de fármacos anteriormente referenciados (dosis de fármaco enlazado de 50 µg/kg correspondió a aproximadamente a dosis de anticuerpo de 2 mg/kg). También se pueden emplear los programas de dosificación múltiple (*por ejemplo*, tratamiento en el día 1, 3, 5, o día 1, 4, 7).

Se mide la media y mediana del volumen tumoral en función del tiempo, con los datos demostrando una actividad anti-tumoral dependiente de la dosis de los conjugados objeto. La dosis mínima efectiva se calcula después y compara con la dosis máxima tolerada.

Ejemplo 32

Preparación de huMy9-6-sulfo-SPDB-1d usando el enlazador 4-nitroPy-sulfo-SPDB

Una reacción que contiene 6 mg/ml de anticuerpo HuMy9-6 y 5 equivalentes molares del enlazador *N*-succinimidil-4-

(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato altamente reactivo (20 mM de materia prima en etanol) se incubó durante 3 h a 25 °C en 50 mM de tampón EPPS a pH 8. El enlazador sin reaccionar se eliminó usando una columna de desalinización NAP (Ilustra Sephadex G-25 Calidad ADN, GE Healthcare). Se determinó que la relación del enlazador al anticuerpo (LAR) era aproximadamente 2,3 basado en la concentración del anticuerpo y concentración de nitropiridina-2-tiona liberada de DTT por UV-Vis ($\epsilon_{394 \text{ nm}} = 14.205 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el 2-tio-4-nitropiridona).

El huMy9-6 modificado con el enlazador se diluyó hasta 2 mg/ml en 50 mM de tampón HEPES a pH 8,5, 10% v/v de DMA, y reaccionó con 2 equivalentes molares del compuesto **1d** por enlazador (5 mM de materia prima en DMA; 4,6 equivalentes por anticuerpo) durante 30 min a 25°C. La terminación de la reacción de intercambio de disulfuro se determinó monitorizando el aumento de absorbancia a 394 nm por UV.

Posteriormente a la reacción, el conjugado se purificó e intercambió el tampón en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, 50 μM de bisulfito sódico a pH 6,2 usando una columna de desalinización (G-25 Sephadex, calidad fina, GE Healthcare).

Se encontró que el conjugado purificado tiene un promedio de 2,1 moléculas de **1d** enlazadas por anticuerpo (por UV-Vis usando los coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15.484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30.115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para **1d**, y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 207.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para huMy9-6), 98% de monómero (por cromatografía de exclusión molecular), <1% de **1d** sin conjugar (por extracción con acetona/HPLC de fase reversa), un rendimiento de 70% de proteína, y un rendimiento global de 32% de **1d**. Ver la FIG. 60.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> IMMUNOGEN, INC.
 - <120> DERIVADOS CITOTÓXICOS DE BENZODIAZEPINA
 - <130> DMN/PE955755EP
 - <140>
 - <141>
 - <150> 61/483.499
 - <151> 06-05-2011
 - <150> 61/443.062
 - <151> 15-02-2011
 - <150> 61/443.092
 - <151> 15-02-2011
 - <160> 14
 - <170> PatentIn version 3.5
 - <210> 1
 - <211> 5
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <221> fuente
 - <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"
 - <400> 1
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Tyr | Phe | Met | Asn |
| 1 | | | | 5 |
- <210> 2
 - <211> 17
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANTE
 5 <222> (14)..(14)
 <223> /reemplazar="Gln" or "His" or "Arg"

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (14)..(14)
 <223> /note="Residue given in the sequence has no preference with respect to the annotations for said position"

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (16) .. (16)
 <223> /reemplazar="His" o "Asn" o "Arg"

<220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (17)..(17)
 <223> /reemplazar="Glu" o "Thr" o "Ser" o "Ala" o "Val"

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (16)..(17)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

30 <400> 2

Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 40 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 3

Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5				

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 55 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 4

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His
1				5					10					15

60 <210> 5

ES 2 567 418 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

10
<400> 5
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

15
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

25
<400> 6
Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

30
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

40
<400> 7
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

45
<210> 8
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50
<220>
<221> fuente
<223> /note="Description of Secuencia Artificial: Synthetic polypeptide"

55
<400> 8

ES 2 567 418 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 567 418 T3

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

ES 2 567 418 T3

35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota="Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético"

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

15 <210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota="Descripción de Secuencia Artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 13

ES 2 567 418 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95
 Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

5 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

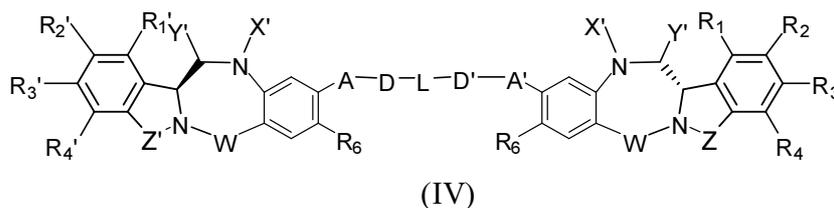
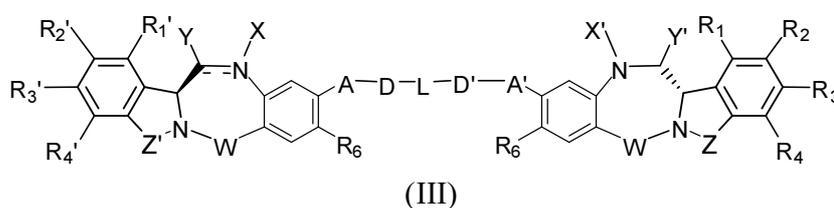
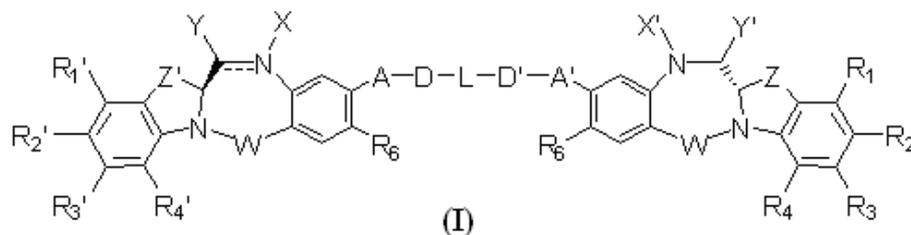
10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: péptido sintético"

<400> 14

15 Ala Leu Ala Leu
 1

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto citotóxico que comprende un grupo de enlace con un grupo reactivo unido a éste capaz de unir covalentemente el compuesto citotóxico a un agente de unión celular (CBA), en donde dicho compuesto citotóxico se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

- 10 la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o una porción protectora amina;
- 15 Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOR', -OCOR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, *etc.*), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido; o,
- 20 Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiofosfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (R'ⁱO)₂PS(OR'ⁱ), R'ⁱS-, R'ⁱSO, R'ⁱSO₂, R'ⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fosforditioato (P(=S)(OR'^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R'^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) o una mezcla de éstos, en donde R'ⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(R')₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; R'ⁱ puede ser además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R'^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R'^k es un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene; 1 a 10 átomos de carbono, ariilo heterocíclico o heteroarilo;
- 30 M es -H o un catión;
- 35 R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un ariilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol

-(CH₂CH₂O)_n-R^c, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;

n es un número entero de 1 a 24;

W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO y SO₂;

X' se selecciona de -H, un grupo protector amina, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un anillo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;

Y' se selecciona de -H, un grupo oxo, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un anillo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M⁺, un sulfato -OSO₃M⁺, una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'', y el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;

R₆ es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halógeno o el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;

Z y Z' se seleccionan independientemente de -(CH₂)_{n'}-, -(CH₂)_{n'}-CR₇R₈-(CH₂)_{na'}-,

-(CH₂)_{n'}-NR₉-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-O-(CH₂)_{na'}- y -(CH₂)_{n'}-S-(CH₂)_{na'}-;

n' y na' son iguales o diferentes, y se seleccionan de 0, 1, 2 y 3;

R₇ y R₈ son iguales o diferentes, y se seleccionan cada uno independientemente de

-H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_{n'}-, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₉ se selecciona independientemente de -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_{n'}-,

A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -O-, oxo

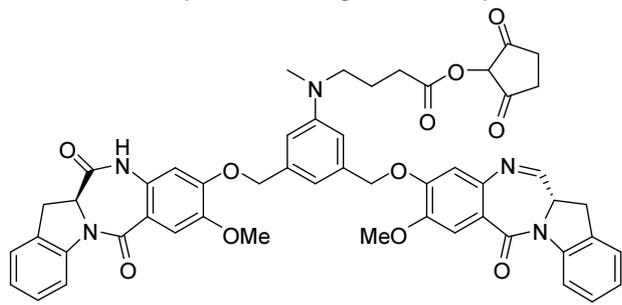
(-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ y -CRR'N(R₅)-,

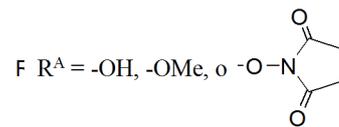
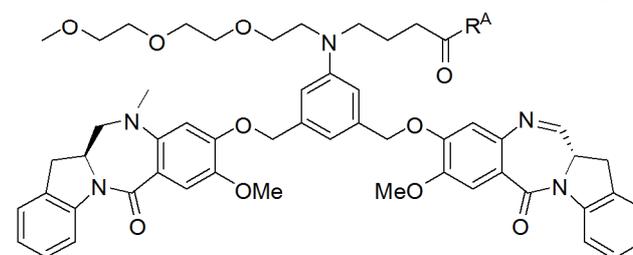
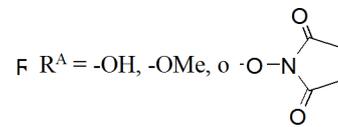
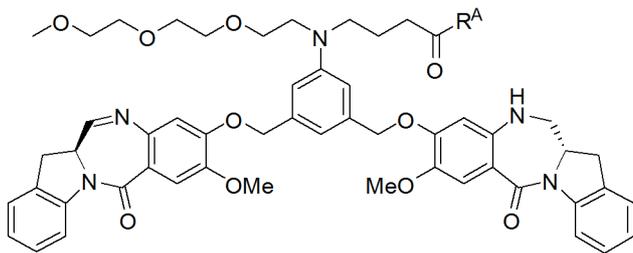
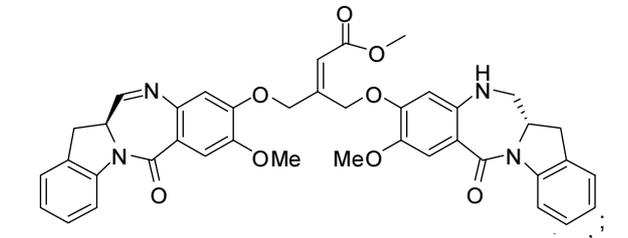
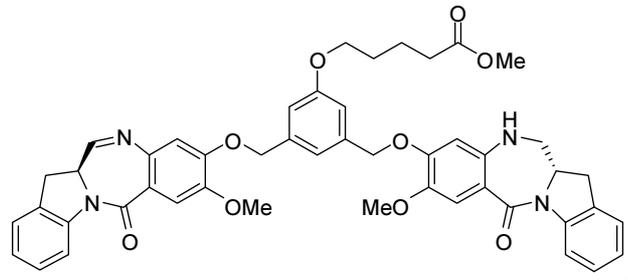
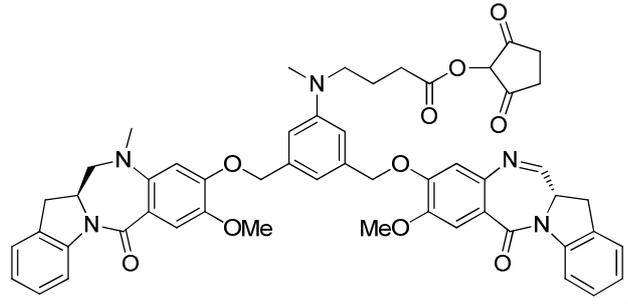
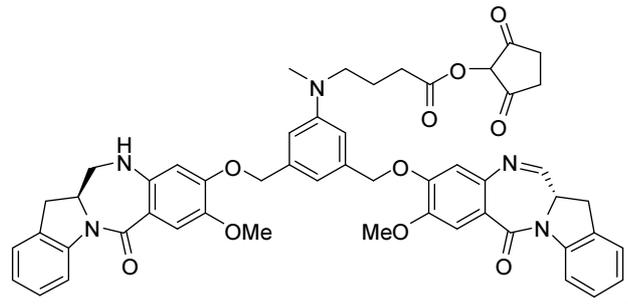
R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

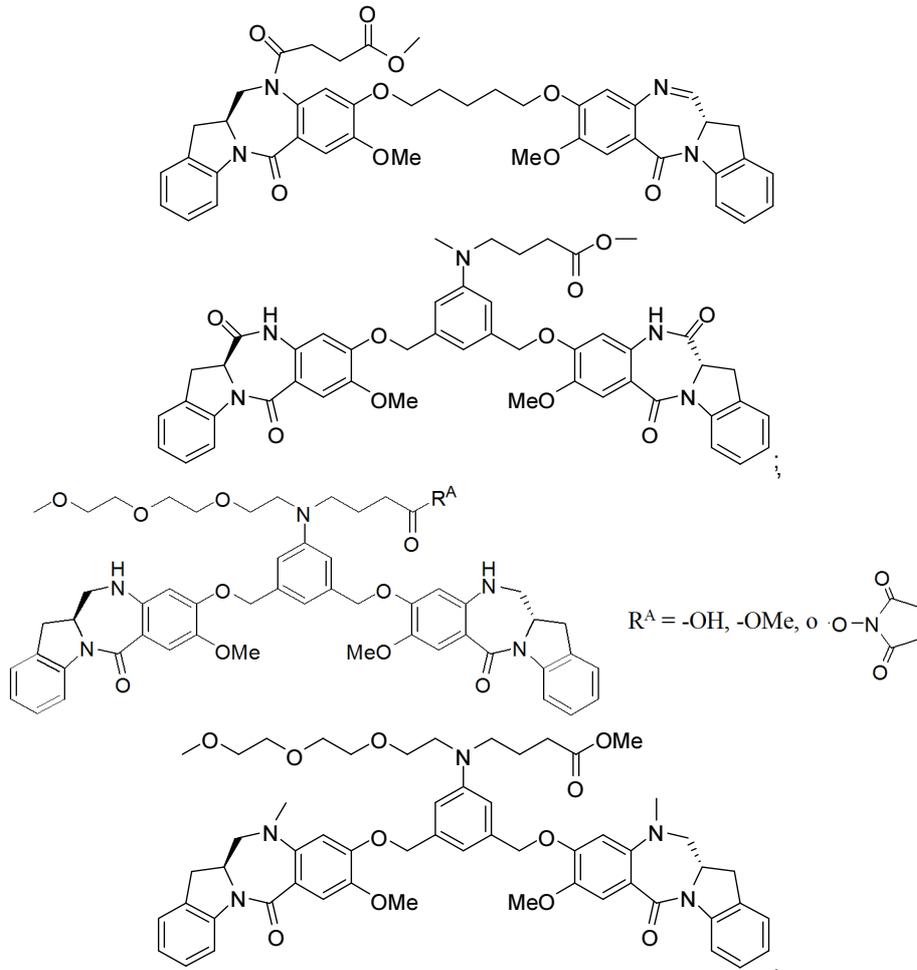
D y D' son iguales o diferentes, y están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_{n'}-,

L está ausente, es el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, una unidad de polietilenglicol -(OCH₂CH₂)_{n'}-, un alquilo o alqueno lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alqueno está opcionalmente sustituido con el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste;

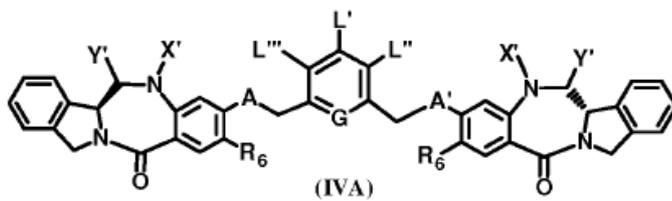
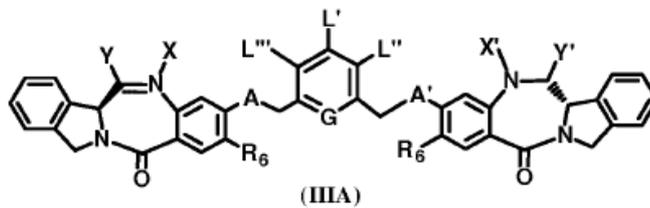
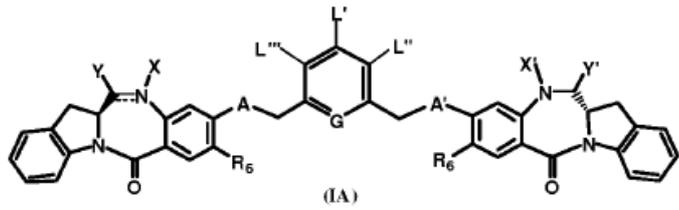
siempre que el compuesto no es uno cualquiera de los siguientes compuestos:







5 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto se representa por una cualquiera de las fórmulas siguientes:

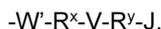


o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

L', L'', y L''' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halógeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato

- 5 -SO₃M, un sulfato -OSO₃M', una sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' y el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, siempre que sólo uno de L', L'' y L''' sea el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste; y
G se selecciona de -CH o -N-.

- 10 3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde L'', y L''' son -H; y L' se representa por la fórmula siguiente:



en donde:

- 15 W' y V son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o se selecciona de $-CR^eR^{e'}$ -, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, o -C(=O)-, o un aminoácido, o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos;

- 20 R^x y R^y son iguales o diferentes, y cada uno independientemente está ausente o es un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que porta 6 a 10 átomos de carbono o un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que porta 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N o S;

- 25 R^e y R^{e'} son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, un alquilo, alqueno, o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino secundario (por ejemplo, -NHR¹⁰¹) o amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un nitrógeno de 5 ó 6 miembros que contiene heterociclo, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono; preferentemente, R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;

- 30 n es un entero de 1 a 24;

- J comprende el grupo reactivo unido a éste, y se selecciona de una maleimida, un haloacetamido, -SH, -SSR^d, -CH₂SH, -CH(Me)SH, -C(Me)₂SH, -NHR^{c1}, -CH₂NHR^{c1}, -NR^{c1}NH₂, -COOH, y -COE, en donde -COE representa un éster reactivo seleccionado de, pero sin limitarse a, N-hidroxisuccinimida éster, N-hidroxi sulfosuccinimida éster, nitrofenil (por ejemplo, 2 ó 4-nitrofenilo) éster, dinitrofenil (por ejemplo, 2,4-dinitrofenilo) éster, sulfo-tetrafluorfenil (por ejemplo, 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilo) éster, y pentafluorfenil éster, y en donde R^{c1} es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y,

- 40 R^d se selecciona de fenilo, nitrofenilo (por ejemplo, 2 ó 4-nitrofenilo), dinitrofenilo (por ejemplo, 2 ó 4-nitrofenilo), carboxinitrofenilo (por ejemplo, 3-carboxi-4-nitrofenilo), piridilo o nitropiridilo (por ejemplo, 4-nitropiridilo).

4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde:

- (i) W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;
45 R^e es H, un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;
R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;
V está ausente, es $-(O-CH_2-CH_2)_n-$, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;
R^y está ausente o es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y
J es -SH, -SSR^d o -COE, en donde -COE es preferentemente N-hidroxisuccinimida éster; o
50 (ii) W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;
R^e es H, Me, o $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$;
n es un número entero de 2 a 6;
R^x es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 6 átomos de carbono;
V y R^y están ausentes; y
55 J es -COE, preferentemente N-hidroxisuccinimida éster.

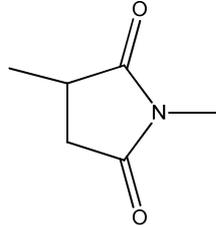
5. El compuesto de la reivindicación 3, en donde L' se representa por cualquiera de las fórmulas siguientes:

- 60 $-W'-[CR_1''R_2'']_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3''R_4'']_b-COE;$
 $-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-[CR_3''R_4'']_b-COE;$ o
 $-NR^e-[CR_1''R_2'']_a-S-Cy-[CR_3''R_4'']_b-COE,$

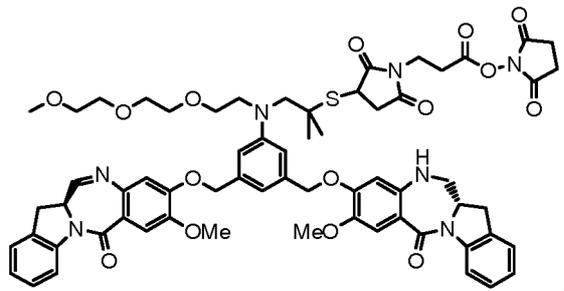
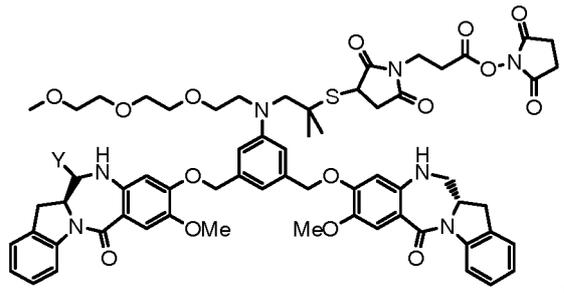
en donde:

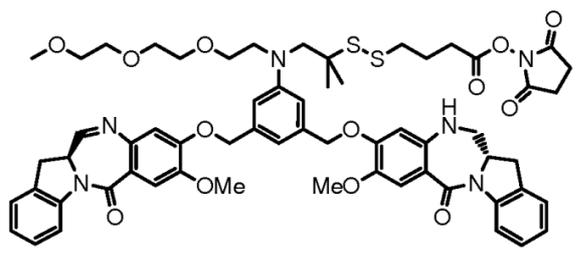
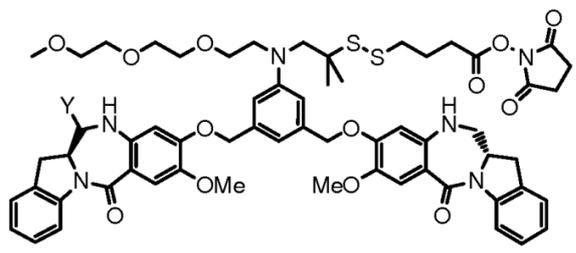
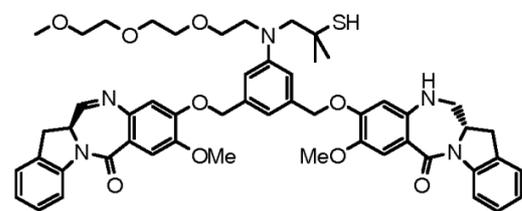
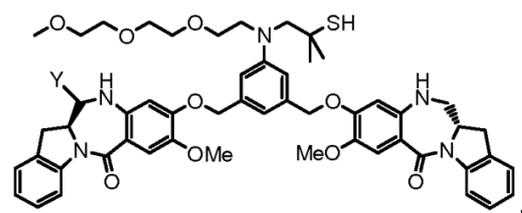
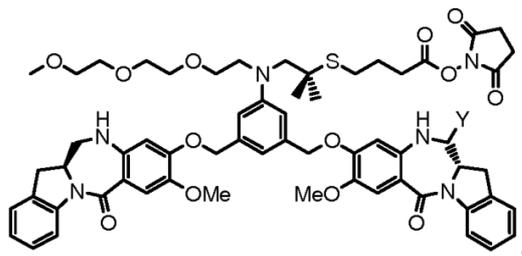
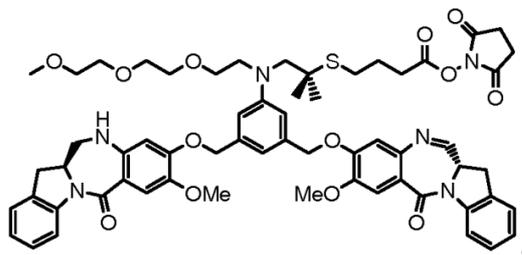
- 65 R₁'', R₂'', y R₃'' son cada uno independientemente -H o -Me;

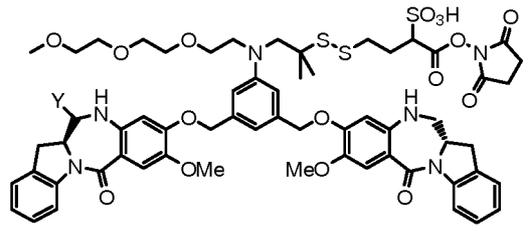
R₄⁺ es -H, -Me, -SO₃H, o -SO₃M⁺, en donde M⁺ es un catión farmacéuticamente aceptable; a es un número entero de 0-2, y b es un número entero de 0-3; y, Cy es un anillo heterocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que porta un N heteroátomo, preferentemente Cy es



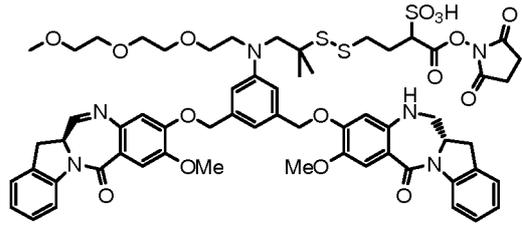
- 5 6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, cuando la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple, Y es un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc.), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido.
- 10 7. El compuesto de la reivindicación 6, en donde dicho compuesto citotóxico tiene la fórmula (I).
- 15 8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:





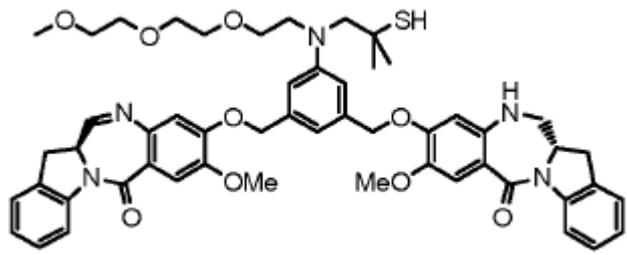
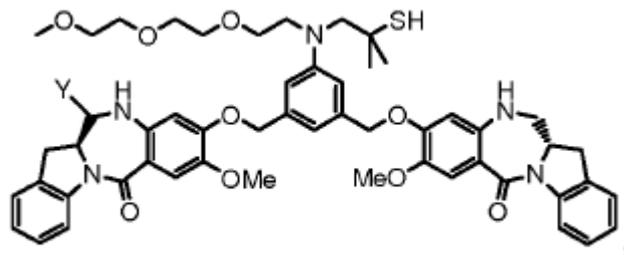


0

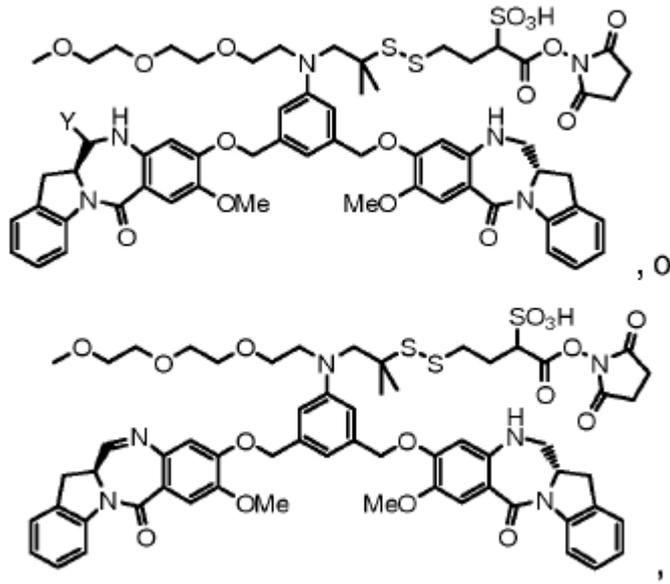


5 o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M) y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

9. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:



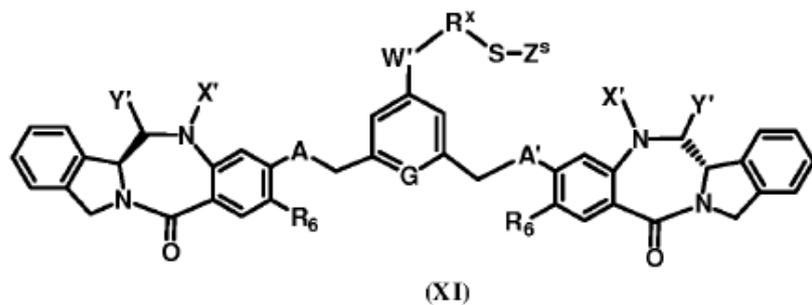
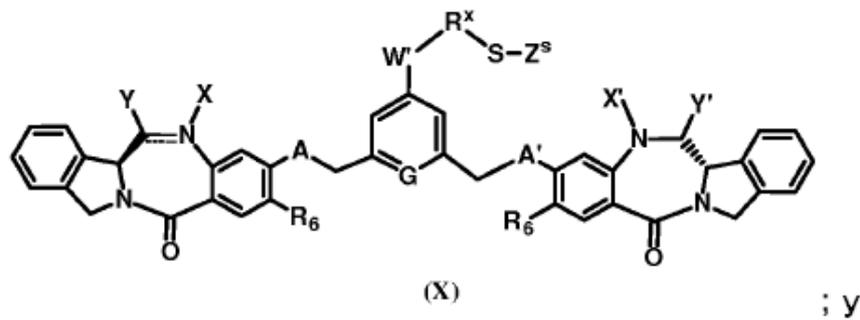
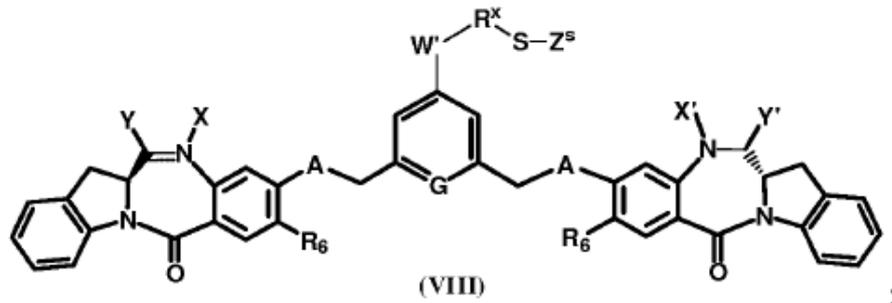
10



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es $-\text{SO}_3\text{M}$ y M es $-\text{H}$ o un catión farmacéuticamente aceptable.

5

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto se representa por una cualquiera de las fórmulas siguientes:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

la doble línea \equiv entre N y C representa un enlace simple o un doble enlace, siempre que cuando sea un doble enlace, X esté ausente e Y sea -H, y cuando sea un enlace simple, X se seleccione de -H, el grupo de enlace con el grupo reactivo unido a éste, o un grupo protector amina (preferentemente X es -H);

Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO₃M, -SO₂M o -OSO₃M, en donde M es -H o un catión tal como Na⁺ o K⁺;

R es -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG -(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero, de 1 a 24 y R^c es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono;

R' y R'' son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, -OH, -OR, -NRR^g, -COR, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo opcionalmente sustituido que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos seleccionados de O, S, N y P, un grupo PEG -

(CH₂CH₂O)_n-R^c, en donde n es un número entero de 1 a 24, preferentemente n es 2, 4 u 8; y R^g es -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo PEG (CH₂CH₂O)_n-R^c;

X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, fenilo, y un grupo protector amina;

Y' se selecciona del grupo que consiste en -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico sustituido o insustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

A y A' se seleccionan de -O- y -S-;

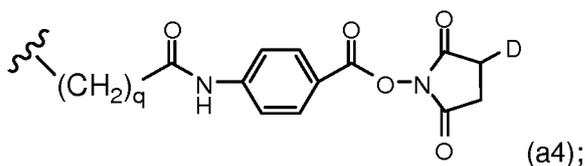
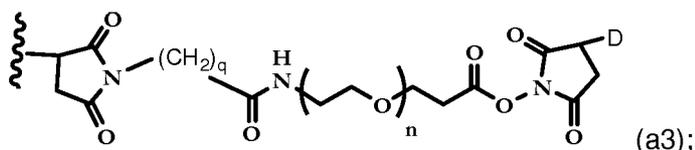
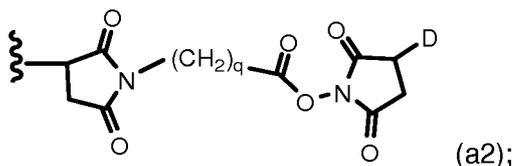
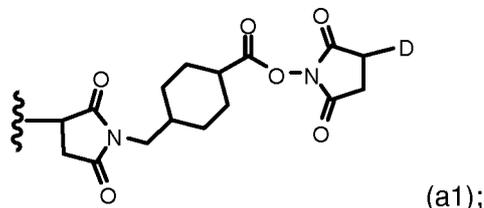
W' está ausente, o se selecciona de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- o -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

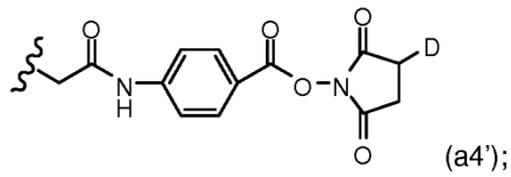
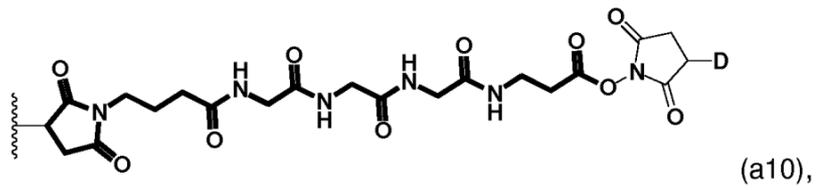
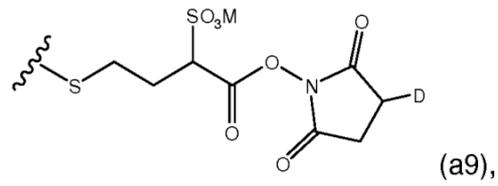
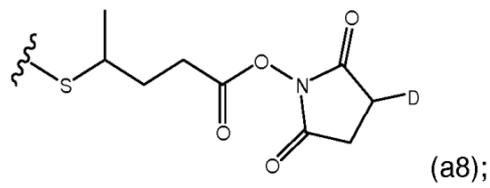
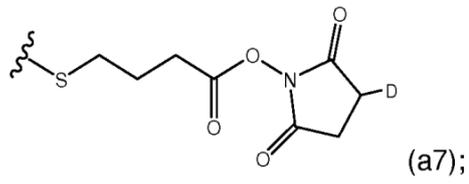
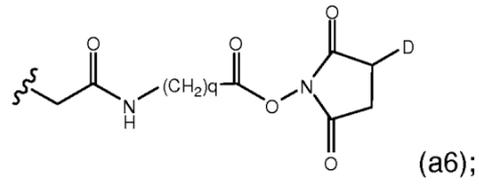
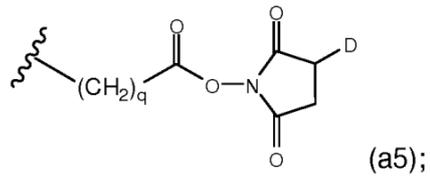
R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

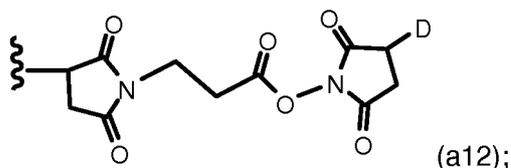
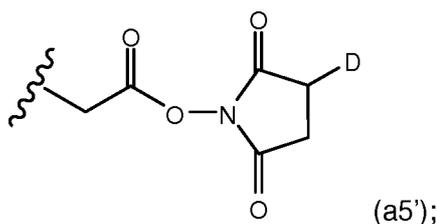
R^e es -H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino secundario (por ejemplo, -NHR¹⁰¹) o un grupo amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;

G se selecciona de -CH- o -N-;

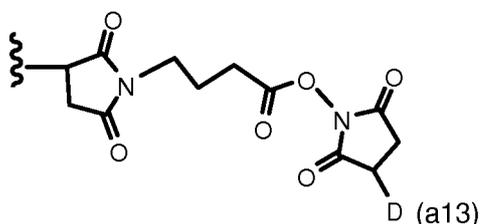
Z^s es -H, o se selecciona de una cualquiera de las siguientes fórmulas:







y



en donde:

5

- q es un número entero de 1 a 5;
- n es un número entero de 2 a 6;
- D es -H o -SO₃M;
- M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺.

10

11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde W' es -N(R^e)-; y R^e es -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde (i) R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, o cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono; o (ii) R^k es -H o -Me, n es 4, y q es 2.

15

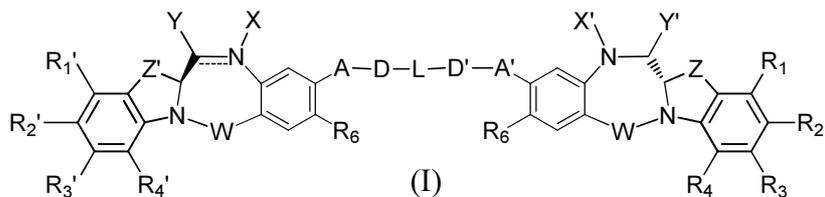
12. El compuesto de la reivindicación 10 u 11, en donde:

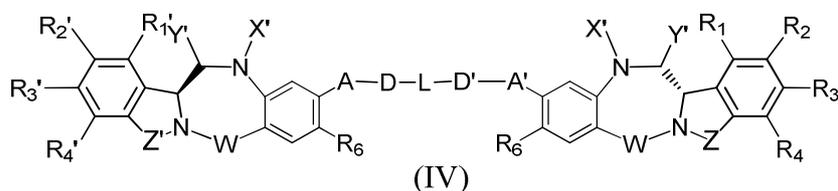
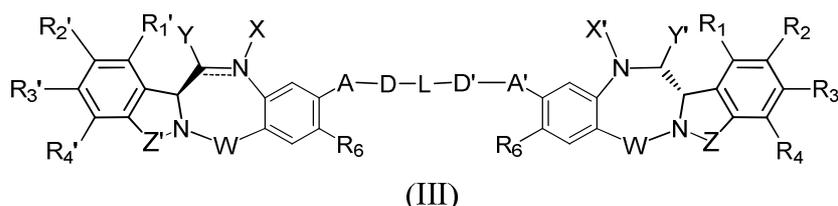
20

- la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble X esté ausente e Y es -H, y cuando sea un enlace simple, X es -H; Y es -OH o -SO₃M;
- M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, Na⁺);
- X' e Y' son ambos -H;
- A y A' son ambos -O-;
- R₆ es -OMe; y
- R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

25

13. Un conjugado que comprende: un compuesto citotóxico y un agente de unión celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico comprende un grupo de enlace que une covalentemente el compuesto citotóxico al CBA, y en donde dicho compuesto citotóxico se representa por una cualquiera de las siguientes fórmulas:

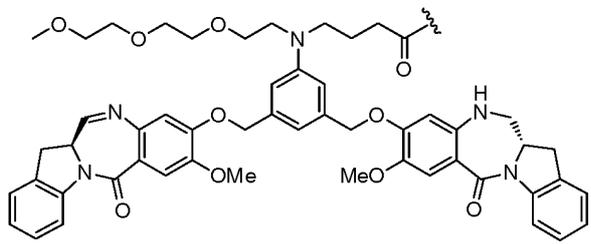


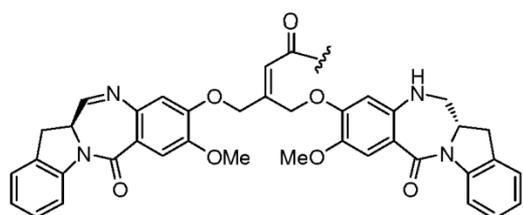
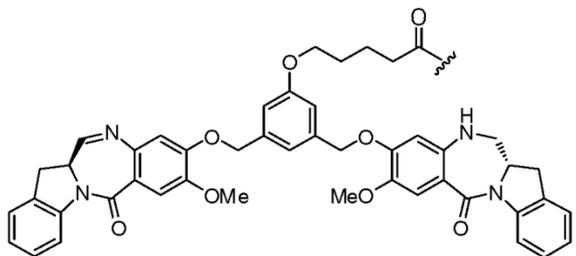
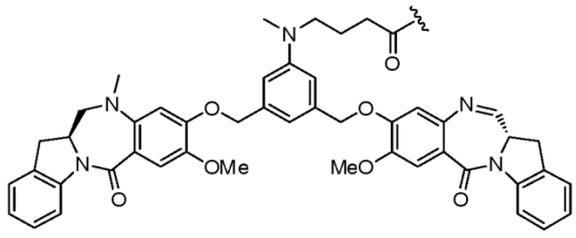
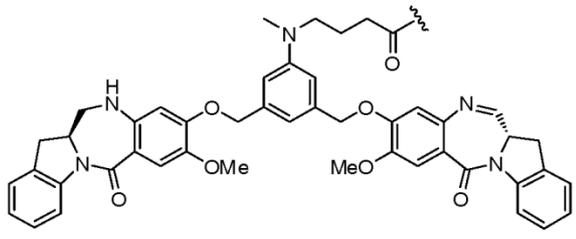
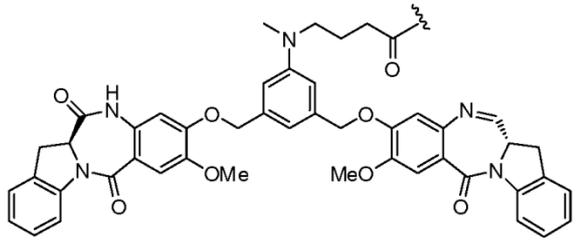
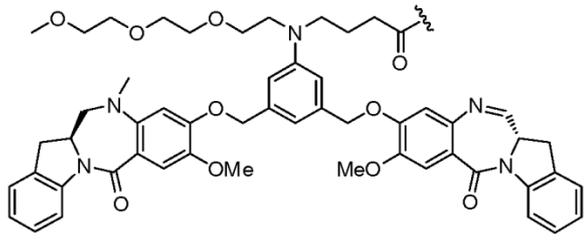


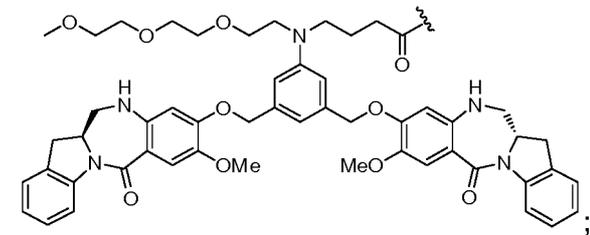
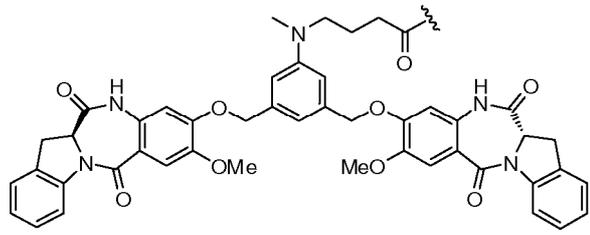
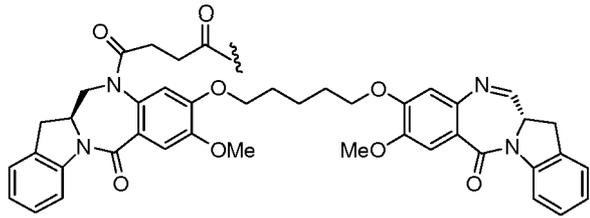
o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

- 5 la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, el grupo de enlace, o una porción protectora amina;
- Y es -H o un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOR', -CONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros
- 10 opcionalmente sustituido (por ejemplo, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido; o,
- Y es un sulfito (HSO₃, HSO₂ o una sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ o HSO₂⁻ formada con un catión), metabisulfito (H₂S₂O₅ o una sal de S₂O₅²⁻ formada con un catión), mono-, di-, tri-, y tetra- tiofosfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ o una sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ o PS₄³⁻ formada con un catión), tio fosfato éster (R'ⁱO)₂PS(OR'ⁱ), R'ⁱS-, R'ⁱSO, R'ⁱSO₂, R'ⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ o una sal de S₂O₃²⁻ formada con un catión), ditionita (HS₂O₄ o una sal de S₂O₄²⁻ formada con un catión), fósforoditioato (P(=S)(OR'^k)(S)(OH) o una sal de éste formada con un catión), ácido hidroxámico (R'^kC(=O)NOH o una sal formada con un catión), formaldehído sulfoxilado (HOCH₂SO₂⁻ o una sal de HOCH₂SO₂⁻ formada con un catión, tal como HOCH₂SO₂Na⁺) o una mezcla de estos, en donde Rⁱ es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de -N(Rⁱ)₂, -CO₂H, -SO₃H, y -PO₃H; Rⁱ puede estar además opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^l es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono; R^k es un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene; 1 a 10 átomos de carbono, arilo heterocíclico o heteroarilo;
- 25 M es -H o un catión;
- R, para cada aparición, se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 30 R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 35 R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o el grupo de enlace;
- 40 n es un número entero de 1 a 24;
- W se selecciona de C=O, C=S, CH₂, BH, SO y SO₂;
- X' se selecciona de -H, un grupo protector amina, el grupo de enlace, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, un arilo opcionalmente sustituido que tiene 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P;
- 45 Y' se selecciona de -H, un grupo oxo, el grupo de enlace, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno, y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 a 6 heteroátomos;
- 50 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un

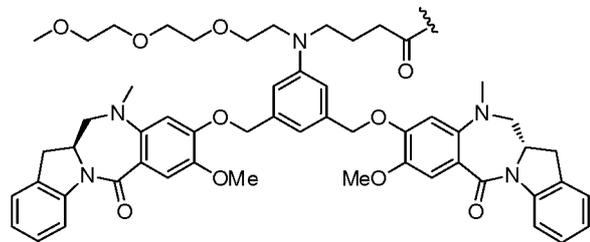
- alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halógeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NCO$, $-NR'COR''$, $-SR$, un sulfóxido representado por $-SOR'$, una sulfona representada por $-SO_2R'$, un sulfonato $-SO_3^M$, un sulfato $-OSO_3^M$, una sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, un azido, $-COR'$, $-OCOR'$, $-OCONR'R''$ y el grupo de enlace;
- 5 R_6 es $-H$, $-R$, $-OR$, $-SR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, halógeno o el grupo de enlace;
- Z y Z' se seleccionan independientemente de $-(CH_2)_{n'}$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ y $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$;
- n' y na' son iguales o diferentes, y se seleccionan de 0, 1, 2 y 3;
- 10 R_7 y R_8 son iguales o diferentes, y se seleccionan cada uno independientemente de $-H$, $-OH$, $-SH$, $-COOH$, $-NHR'$, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, un aminoácido, una unidad peptídica que porta 2 a 6 aminoácidos, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;
- 15 R_9 se selecciona independientemente de $-H$, un alquilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$;
- A y A' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de $-O-$, oxo $(-C(=O)-)$, $-CRR'O-$, $-CRR'-$, $-S-$, $-CRR'S-$, $-N(R_5)-$ y $-CRR'N(R_5)-$, R_5 para cada aparición es independientemente $-H$ o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- 20 D y D' son iguales o diferentes, y están independientemente ausentes o se seleccionan del grupo que consiste en un alquilo, alqueniilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un aminoácido, un péptido que porta 2 a 6 aminoácidos, y una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$;
- 25 L está ausente, es el grupo de enlace, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, un alquilo o alqueniilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un grupo fenilo, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros o un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros que tiene 1 a 6 heteroátomos independientemente seleccionados de O, S, N y P, en donde el alquilo o alqueniilo está opcionalmente sustituido con el grupo de enlace; el fenilo o anillo heterocíclico o heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente puede ser el grupo de enlace;
- 30 en donde el compuesto no es:





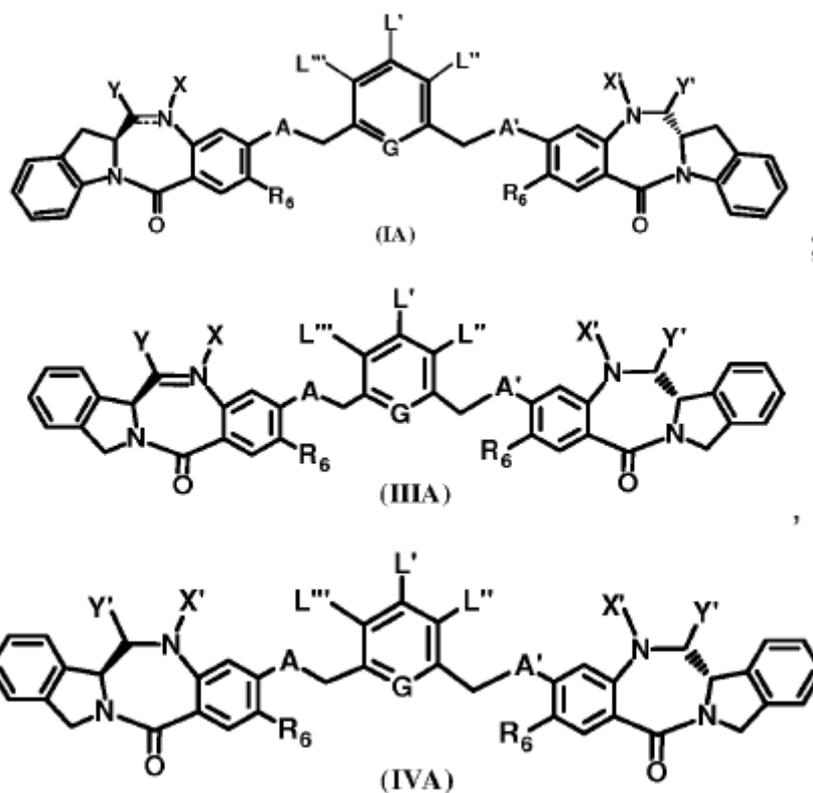


o



5

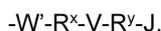
14. El conjugado de la reivindicación 13, en donde el compuesto se representa por una cualquiera de las fórmulas siguientes:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

L', L'', y L''' son iguales o diferentes, y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halógeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, un sulfóxido representado por -SOR', una sulfona representada por -SO₂R', un sulfonato -SO₃M, un sulfato -OSO₃M, una sulfonamida representada por SO₂NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' y el grupo de enlace, siempre que sólo uno de L', L'', y L''' es el grupo de enlace; y G se selecciona de -CH- o -N-.

15. El conjugado de la reivindicación 14, en donde L'' y L''' son -H; y L' se representa por la fórmula siguiente:



en donde:

W' y V son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o se selecciona de -CR^eR^{e'}-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, o -C(=O)-, o un aminoácido, o un péptido que tiene 2 a 8 aminoácidos;

R^x y R^y son iguales o diferentes, y cada uno está independientemente ausente, o es un alquilo, alqueno, o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que porta 6 a 10 átomos de carbono o un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que porta 1 a 3 heteroátomos seleccionados de O, N o S;

R^e y R^{e'} son iguales o diferentes, y se seleccionan de -H, un alquilo, alqueno, o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que porta opcionalmente un grupo amino secundario (por ejemplo, -NHR¹⁰¹) o amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un heterociclo de 5 ó 6 miembros que contiene nitrógeno, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono; preferentemente, R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;

n es un entero de 1 a 24; y

J está covalentemente unido a CBA, y se selecciona de una succinimida, un acetamido, -S-, -SS-, -CH₂S-, -CH(Me)S-, -C(Me)₂S-, -NR^{c1}-, -CH₂NR^{c1}-, -NR^{c1}N-, y -C(=O)-, en donde R^{c1} es -H o un alquilo lineal o ramificado sustituido o insustituido que tiene 1 a 4 átomos de

carbono.

16. El conjugado de la reivindicación 15, en donde:

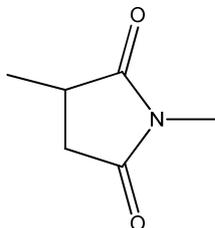
- 5 (i) W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;
 R^e es -H, un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;
 R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono;
 V está ausente, es -(O-CH₂-CH₂)_n-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;
 R^y está ausente o es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono; y
 10 J es -S-, -SS-, o -C(=O)-; o
 (ii) W' es -O-, -N(R^e)- o -N(R^e)-C(=O)-;
 R^e es -H, -Me, o -(CH₂-CH₂-O)_n-Me;
 n es un número entero de 2 a 6;
 R^x es un alquilo lineal o ramificado que porta 1 a 6 átomos de carbono;
 15 V y R^y están ausentes; y
 J es -C(=O)-.

17. El conjugado de la reivindicación 14, en donde L' se representa por cualquiera de las fórmulas siguientes:

- 20 -W'-[CR₁^rR₂^r]_a-V-[Cy]₀₋₁-[CR₃^rR₄^r]_b-C(=O)-;
 - NR^e-[CR₁^rR₂^r]_a-S-[CR₃^rR₄^r]_b-C(=O)-; o
 25 - NR^e-[CR₁^rR₂^r]_a-S-Cy-[CR₃^rR₄^r]_b-C(=O)-,

en donde:

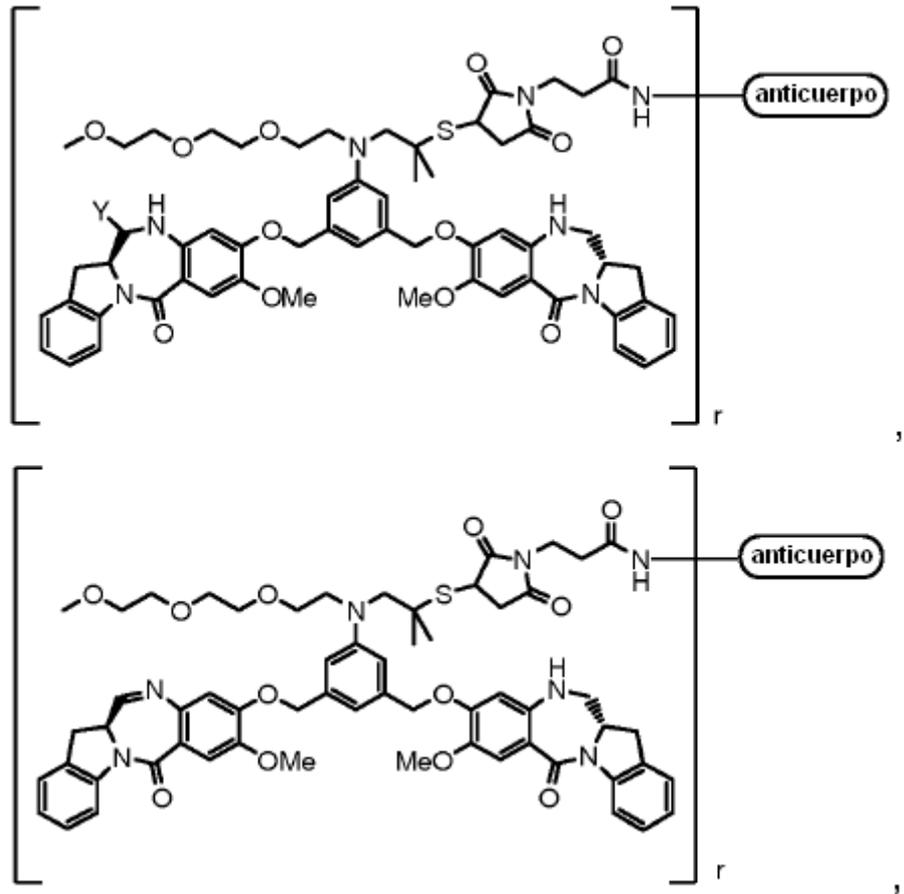
- R₁^r, R₂^r, y R₃^r son cada uno independientemente -H o -Me;
 R₄^r es -H, -Me, -SO₃H, o -SO₃M⁺, en donde M⁺ es un catión farmacéuticamente aceptable;
 a es un número entero de 0-2, y b es un número entero de 0-3; y,
 30 Cy es un anillo heterocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que porta un N heteroátomo, preferentemente Cy es

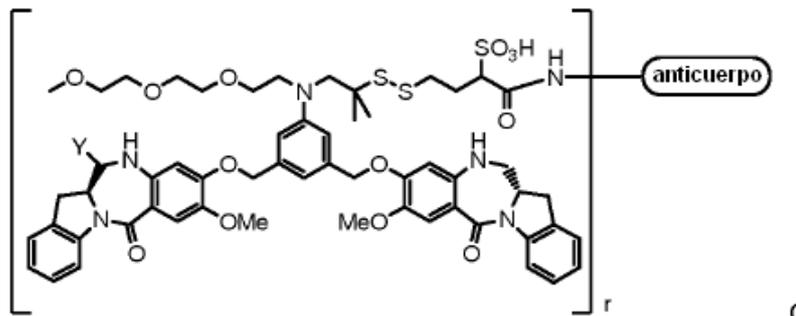
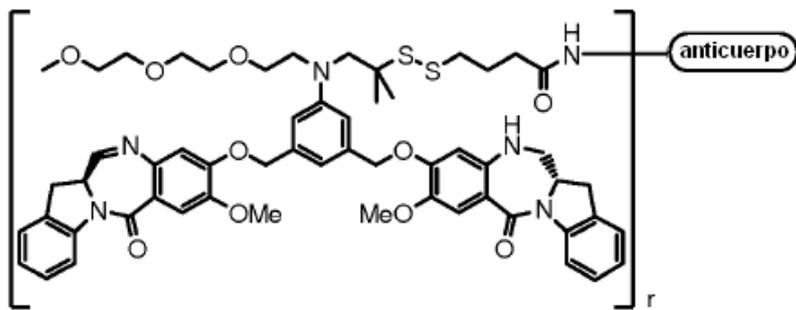
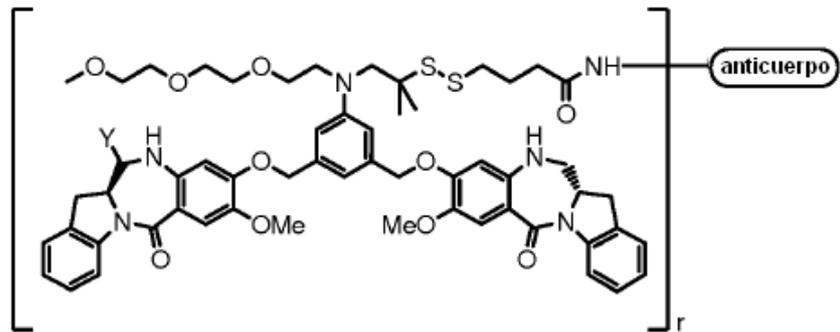
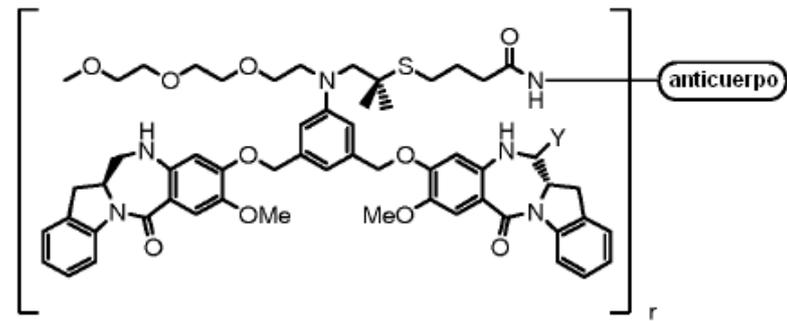
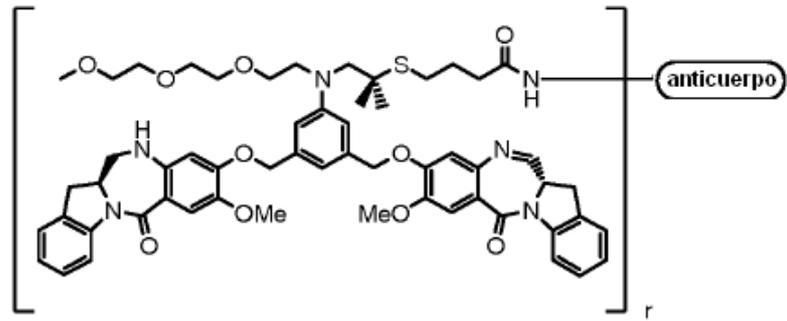


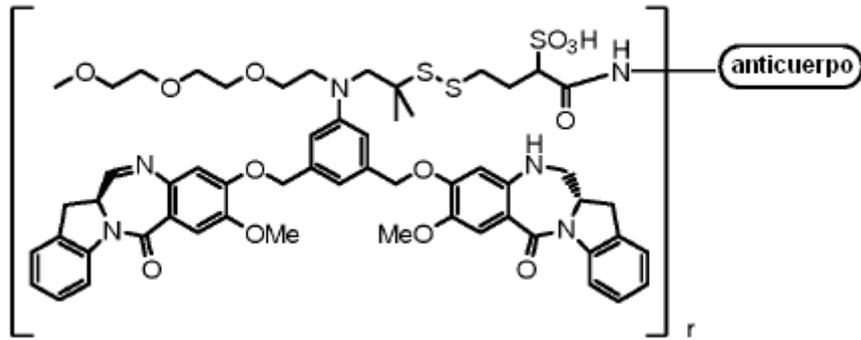
18. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde, cuando la doble línea == entre N y C
 35 representa un enlace simple, Y es un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'',
 -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido (*por
 ejemplo*, piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, *etc.*), un guanidinio representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un
 aminoácido, o un péptido representado por -NRCOP', en donde P' es un aminoácido o un polipéptido que contiene
 40 entre 2 a 20 unidades de aminoácidos, -SR, -SOR', -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, halógeno, ciano y un azido.

19. El conjugado de la reivindicación 18, en donde dicho compuesto citotóxico tiene la fórmula (I).

20. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado es:



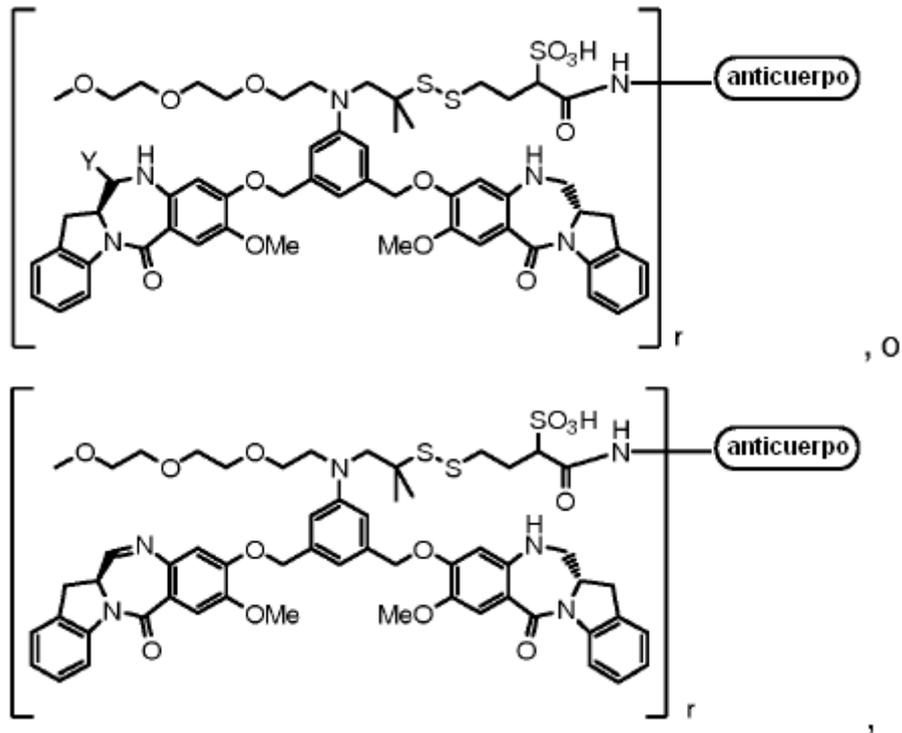




o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde r es un número entero de 1 a 10, Y es -H o -SO₃M (por ejemplo, Y es -SO₃M), y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

5

21. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado es:



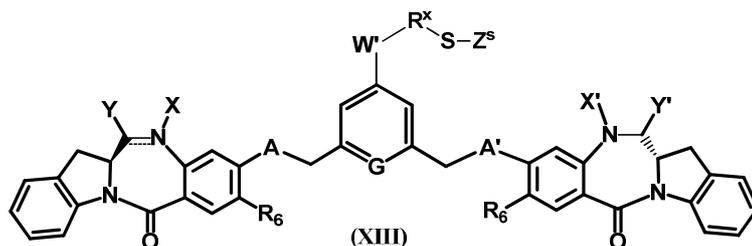
o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde r es un número entero de 1 a 10, Y es -SO₃M, y M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable.

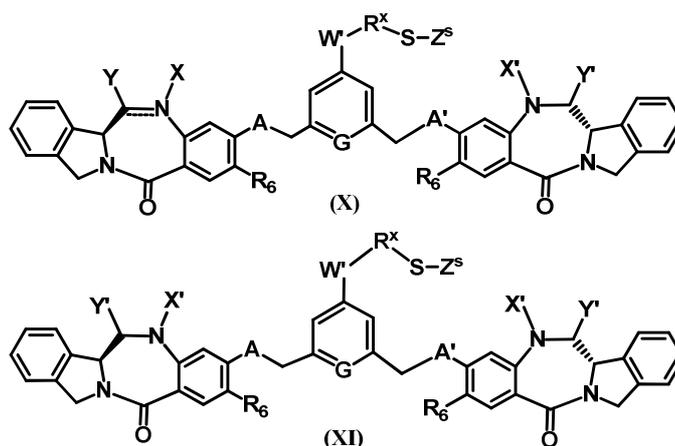
10

22. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-21, en donde el anticuerpo es huMy9-6.

23. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula:

15

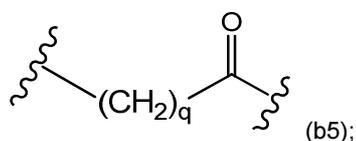
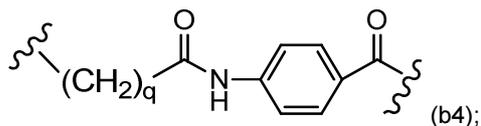
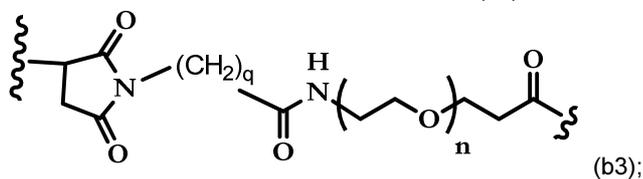
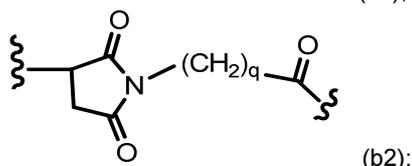
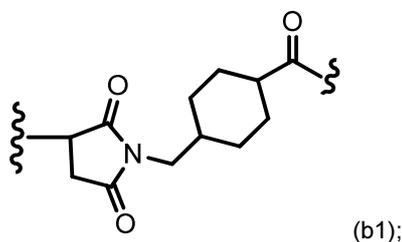




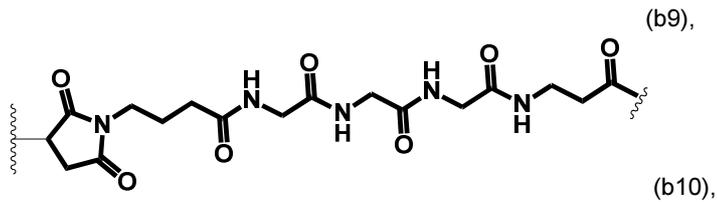
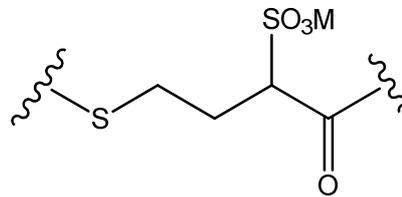
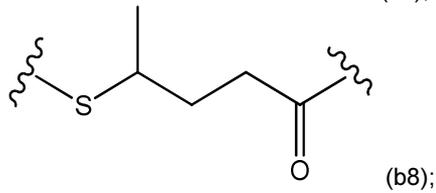
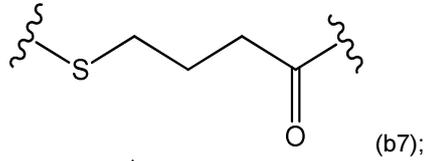
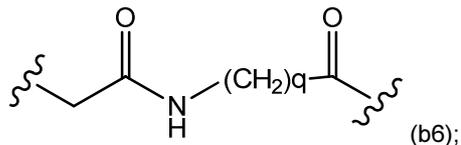
o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde:

- 5
- W' está ausente, o se selecciona de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S-, -CH₂-S-, o -CH₂NR^e-;
- R^x está ausente o se selecciona de un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- R^e es -H, un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado, cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono, que
- 10 porta opcionalmente un grupo amino secundario (*por ejemplo*, -NHR¹⁰¹) o amino terciario (-NR¹⁰¹R¹⁰²) o un heterociclo de 5 ó 6 miembros que contiene nitrógeno, tal como piperidina o morfolina, en donde R¹⁰¹ y R¹⁰² son cada uno independientemente un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono;
- n es un número entero de 2 a 6;
- 15 Z^s está unido al CBA, y se selecciona de:

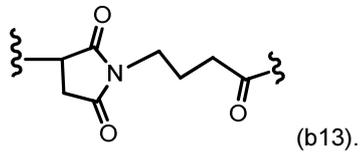
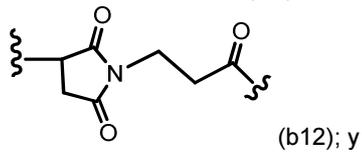
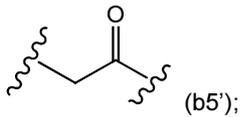
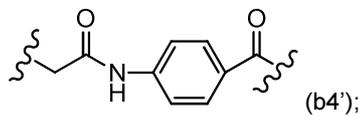
un enlace;



20



5



10 en donde:

q es un número entero de 1 a 5; y,
M es -H o un catión, tal como Na⁺ o K⁺.

15 24. El conjugado de la reivindicación 23, en donde W' es -N(R^e)-; R^e es -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, en donde

(i) R^k es un -H, un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 6 átomos de carbono; o (ii) R^k es -H o -Me, n es 4, y q es 2.

20 25. El conjugado de la reivindicación 23 ó 24, en donde:

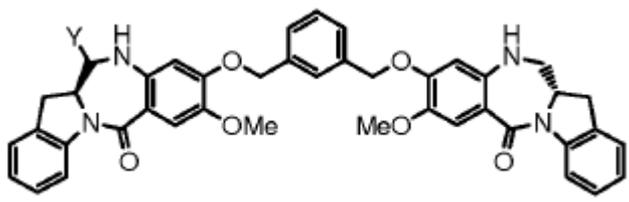
la doble línea == entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble X esté ausente e Y es -H, y cuando sea un enlace simple, X es -H; Y es -OH o -SO₃M;

M es -H o un catión farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, Na⁺);
 X' e Y' son ambos -H;
 A y A' son ambos -O-;
 R₆ es -OMe; y
 R^x es un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 6 átomos de carbono.

26. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-25, en donde el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena única, o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un dominio de anticuerpo, un fragmento de dominio de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo modificado en superficie, un anticuerpo de cadena única modificado en superficie, o un fragmento de anticuerpo modificado en superficie, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena única, o un fragmento de anticuerpo monoclonal de éste, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única humanizado, o un fragmento de anticuerpo humanizado, una linfoquina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias, o una molécula transportadora de nutrientes.

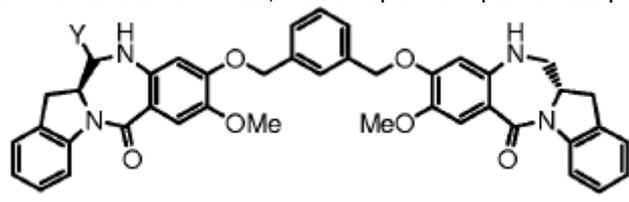
27. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-25 y un portador farmacéuticamente aceptable.

28. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13-26, o un compuesto representado por la fórmula siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -SO₃M), y M es -H, o un catión farmacéuticamente aceptable de éste, para uso como un medicamento.

29. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 13-26, o un compuesto representado por la fórmula siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en donde Y es -H o -SO₃M (*por ejemplo*, Y es -SO₃M), y M es -H, o un catión farmacéuticamente aceptable de éste, para uso en un método para inhibir el crecimiento anormal de la célula o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmune, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad de riñón en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o del conjugado y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico.

30. El compuesto o conjugado para el uso de la reivindicación 29, que es para tratar:

- (i) una afección seleccionada del grupo que consiste en: cáncer, artritis reumatoide, esclérosis múltiple, enfermedad injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, y deficiencia inmune; o
- (ii) un cáncer,

opcionalmente en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en; cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de cuello y cabeza, melanoma, cáncer colorectal, cáncer gástrico, cáncer escamoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, cáncer testicular, carcinoma de células de Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cánceres de órganos linfáticos y malignidad hematológica incluyendo leucemia (leucemia

5 linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena Aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica aguda (AMOL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular de células grandes, leucemia de células T adultas), linfoma (linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfomas de Hodgkin (esclerosis nodular, celularidad mixta, rica en linfocitos, linfocitos agotados o no agotados, y linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos), linfomas no-Hodgkin (todos los subtipos), leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmático (tales como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, neoplasma de células plasmáticas (mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedades de deposición de inmunoglobulina monoclonal, enfermedades de cadena pesada), linfoma extranodal de células B marginales (linfoma de MALT), linfoma nodal zona marginal de células B (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastinal (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria, linfoma de Burkitt/leucemia, leucemia prolinfocítica de células T, Leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma extranodal de células T/NK (tipo nasal), linfoma de células T tipo enteropático, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma blástico de células NK, micosis fungoides / síndrome de Sézary, trastornos primarios cutáneos linfoproliferativos de células T positivas a CD30, linfoma primario cutáneo de células grandes anaplásticas, papulosis linfomatoide, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma periférico de células T (inespecífico), linfoma de células grandes anaplásticas), y mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler).

20
31. El compuesto o conjugado para el uso de la reivindicación 29, que es para tratar leucemia mielógena aguda (AML).

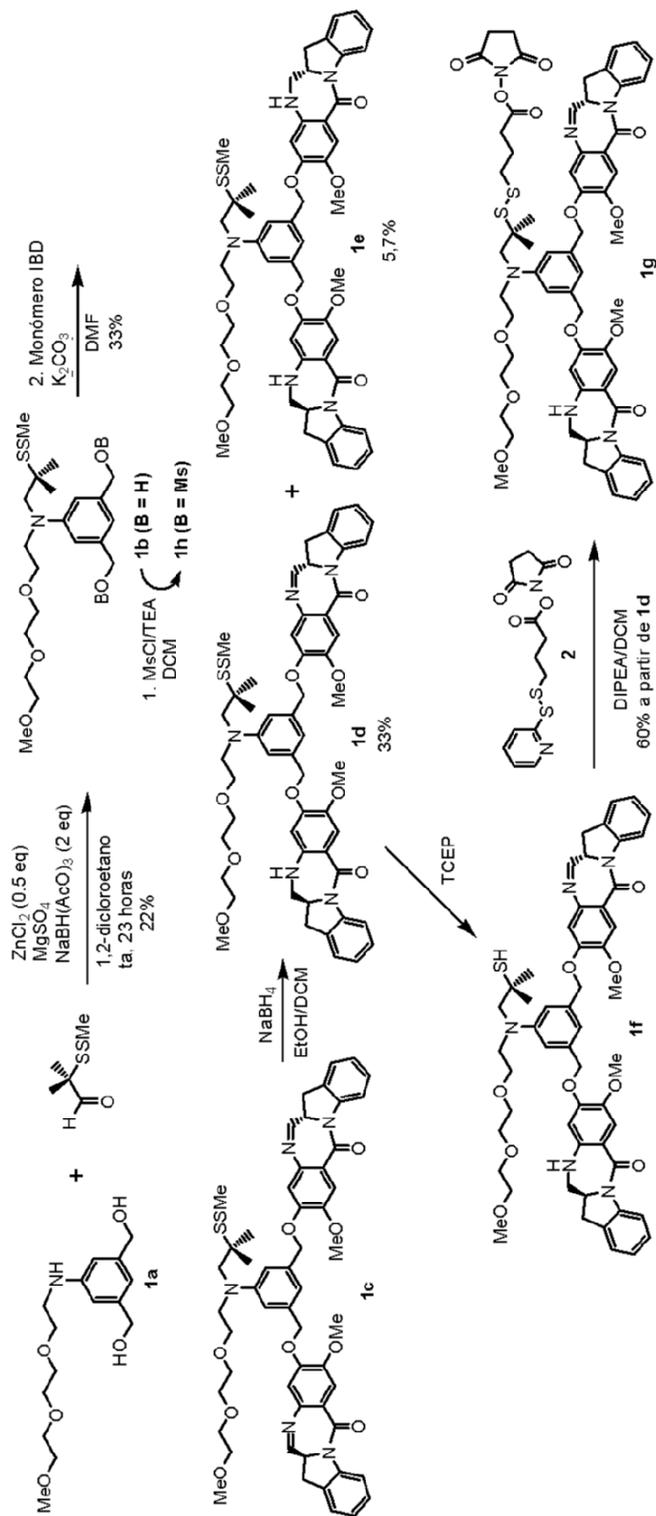
Figura 1. Esquema de síntesis del enlazador **1b** y dímeros **1d-g**

Figura 2. Esquema de síntesis de los dímeros 2a-b

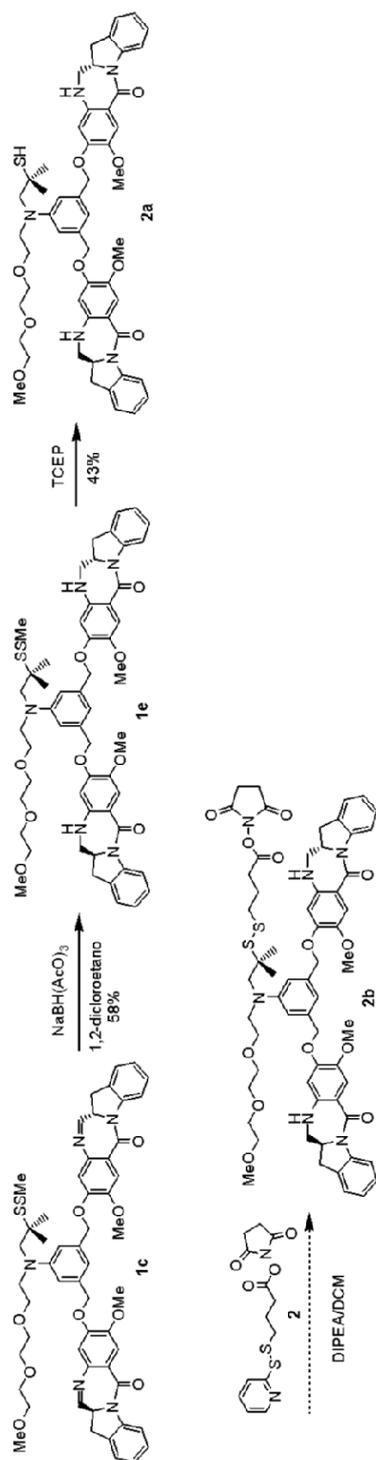


Figura 3. Esquema de síntesis de los dímeros 3e-g

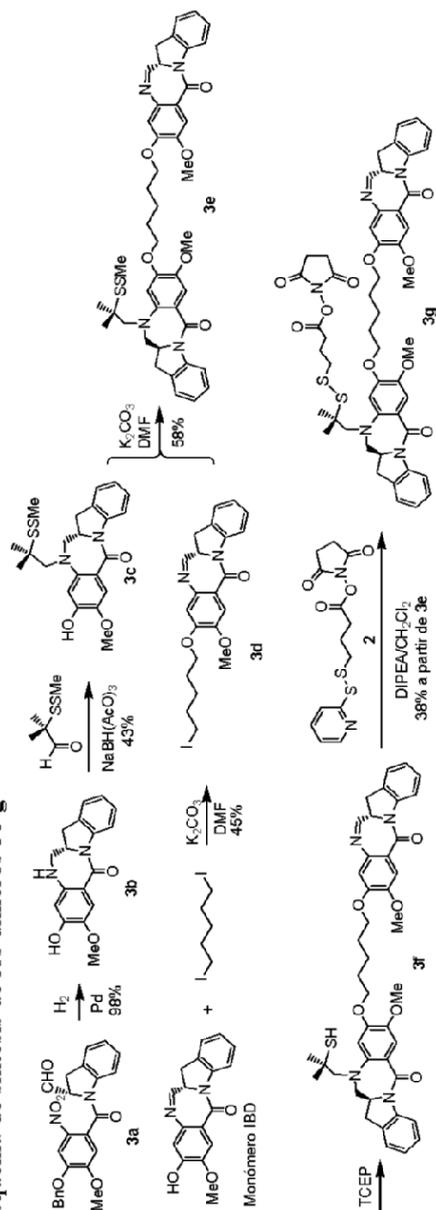


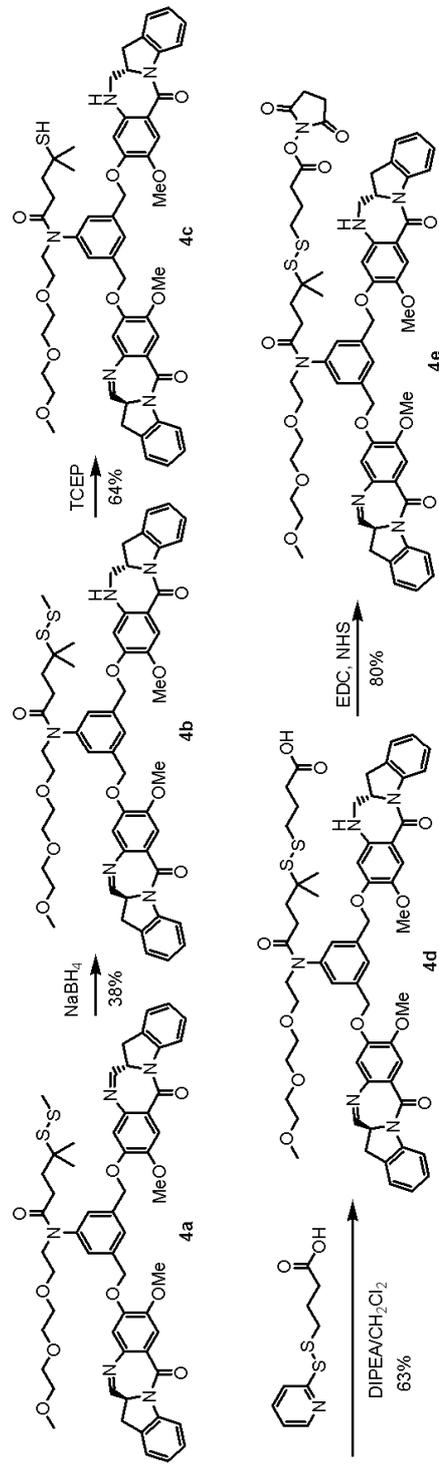
Figura 4. Esquema de síntesis de los dímeros **4b-e**

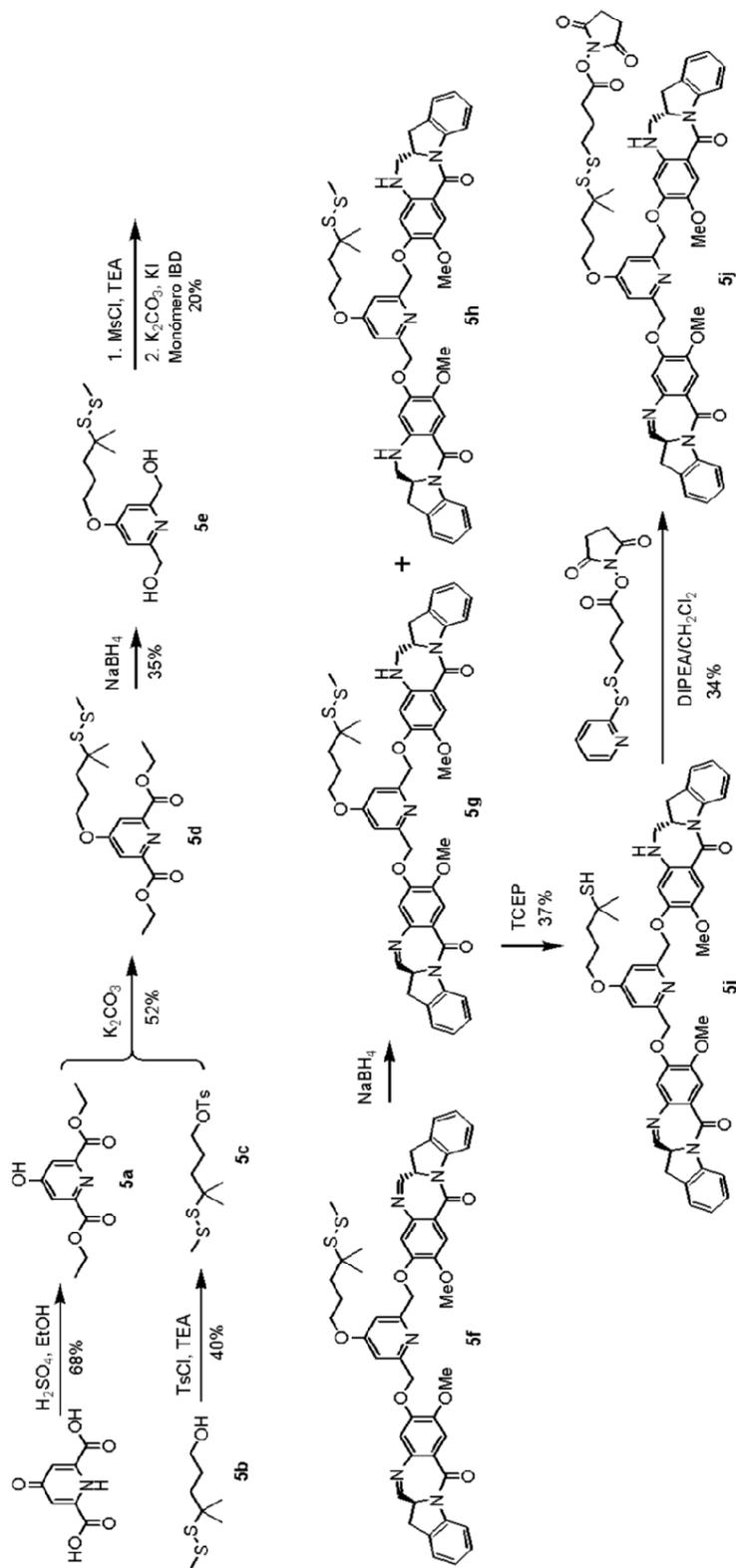
Figura 5. Esquema de síntesis del enlazador **5e** y dímeros **5g-j**

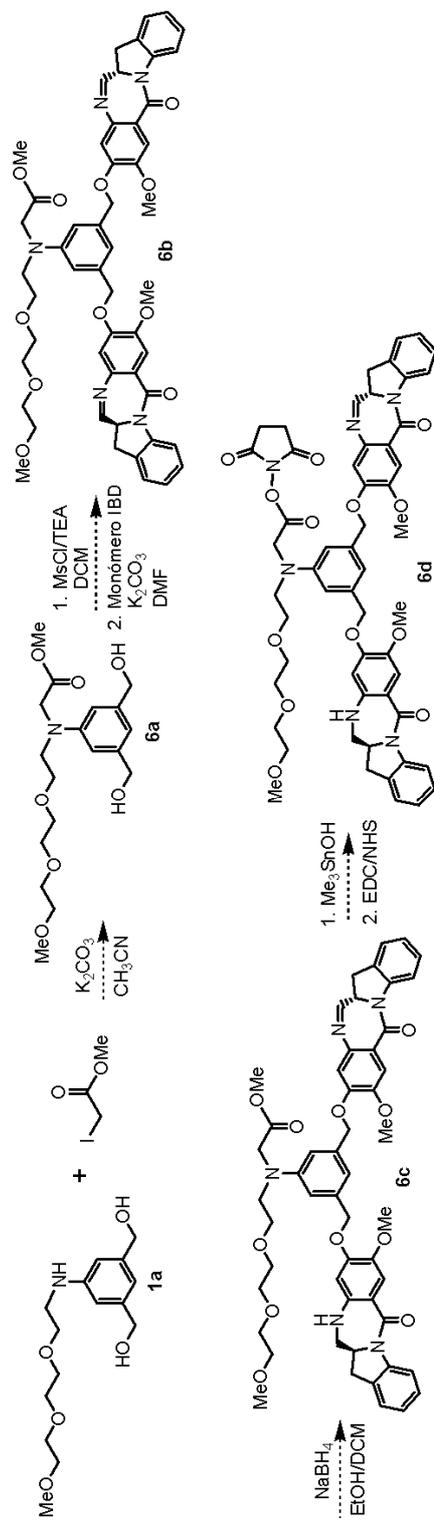
Figura 6. Esquema de síntesis del enlazador **6a** y dímeros **6c-d**

Figura 7. Esquema de síntesis de los enlaces modificados con PEG **7b** y los dímeros **7d-f**

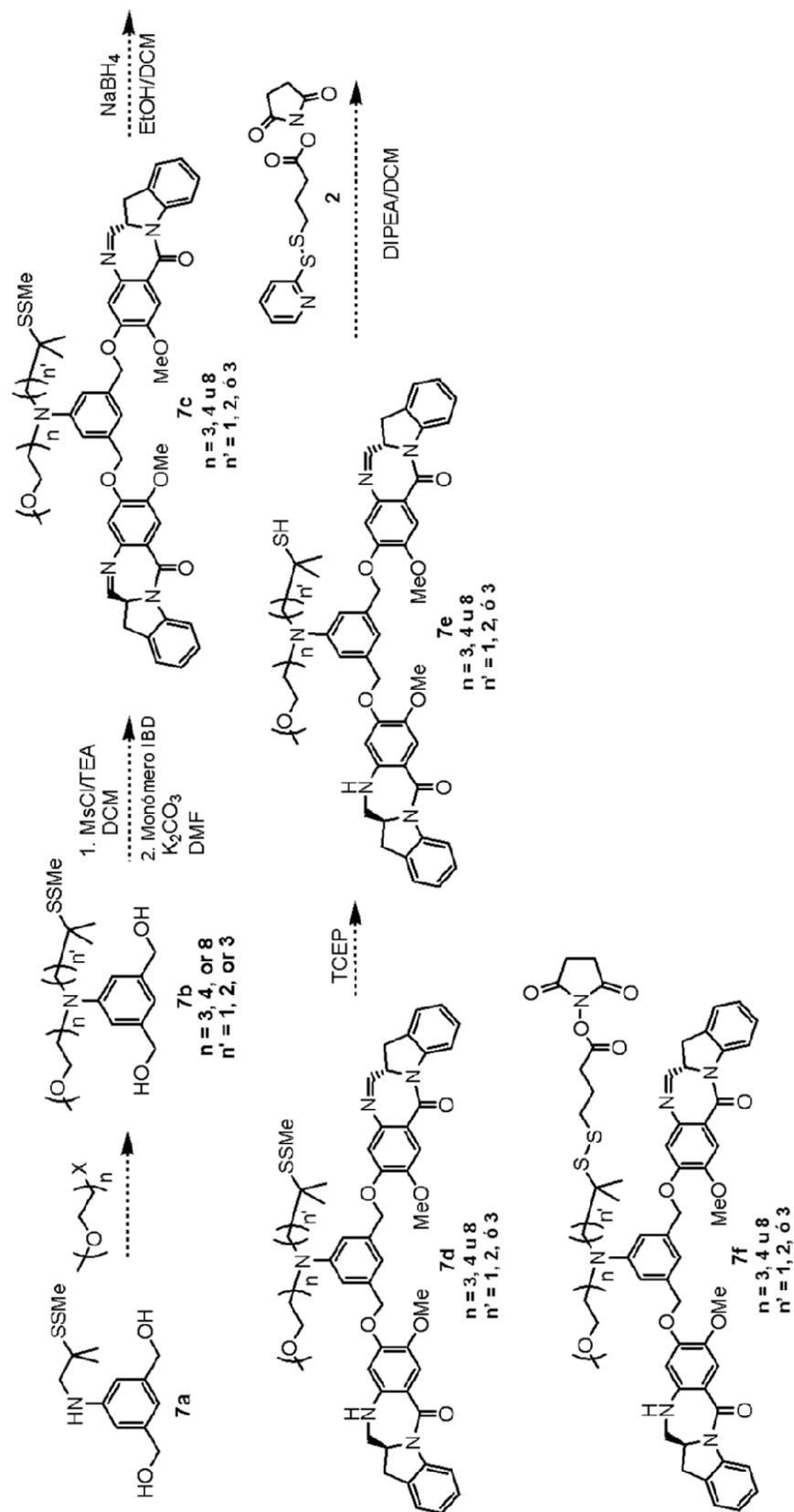


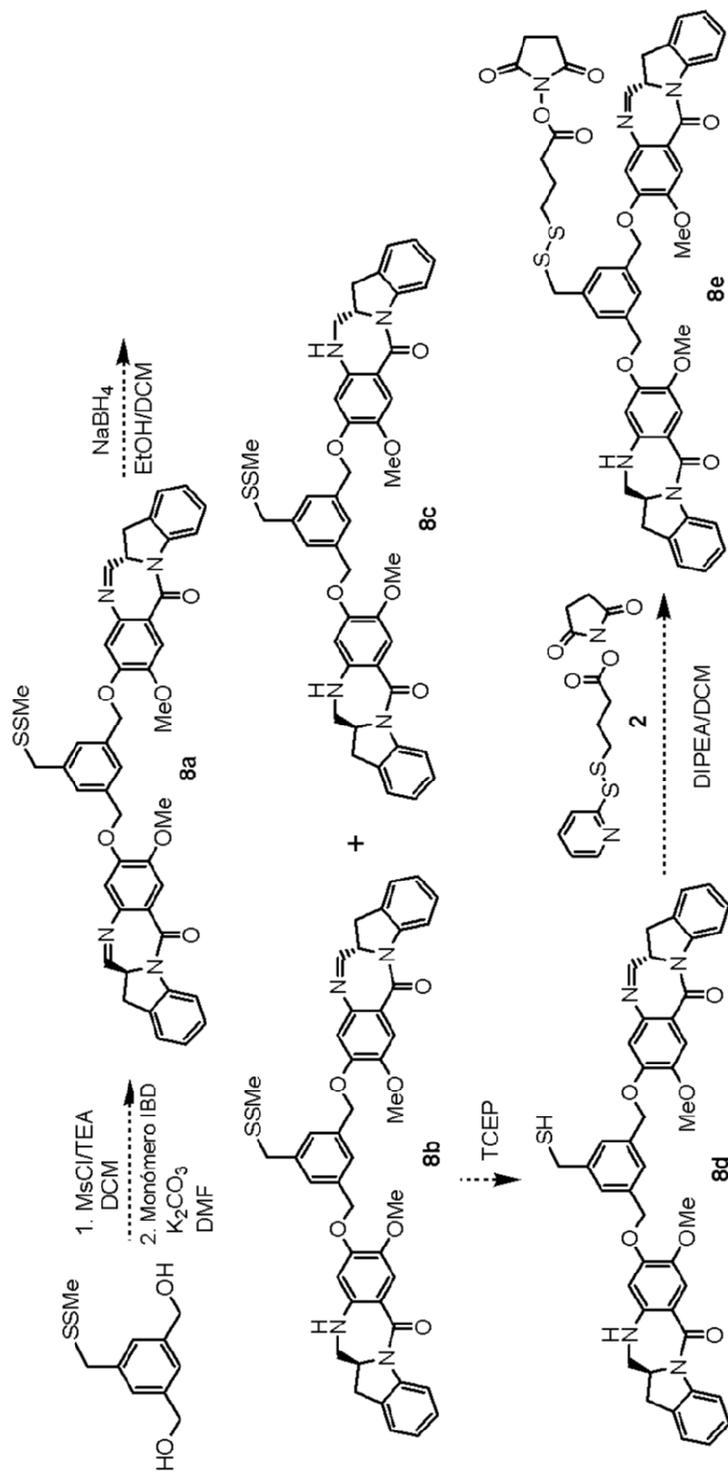
Figura 8. Esquema de síntesis de dímeros **8b-e** que contienen tiol

Figura 9. Esquema de síntesis de dímeros **17d-g** que contienen una amina terciaria

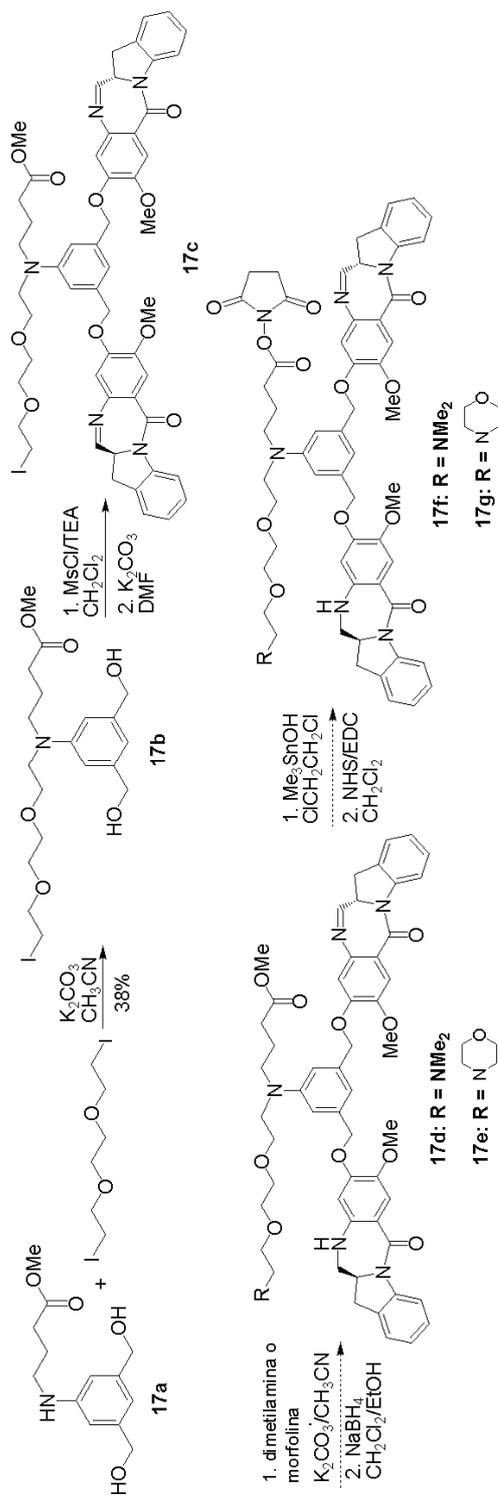


Figura 11. Esquema de síntesis de los dímeros **21f-g** que contienen un enlazador peptídico

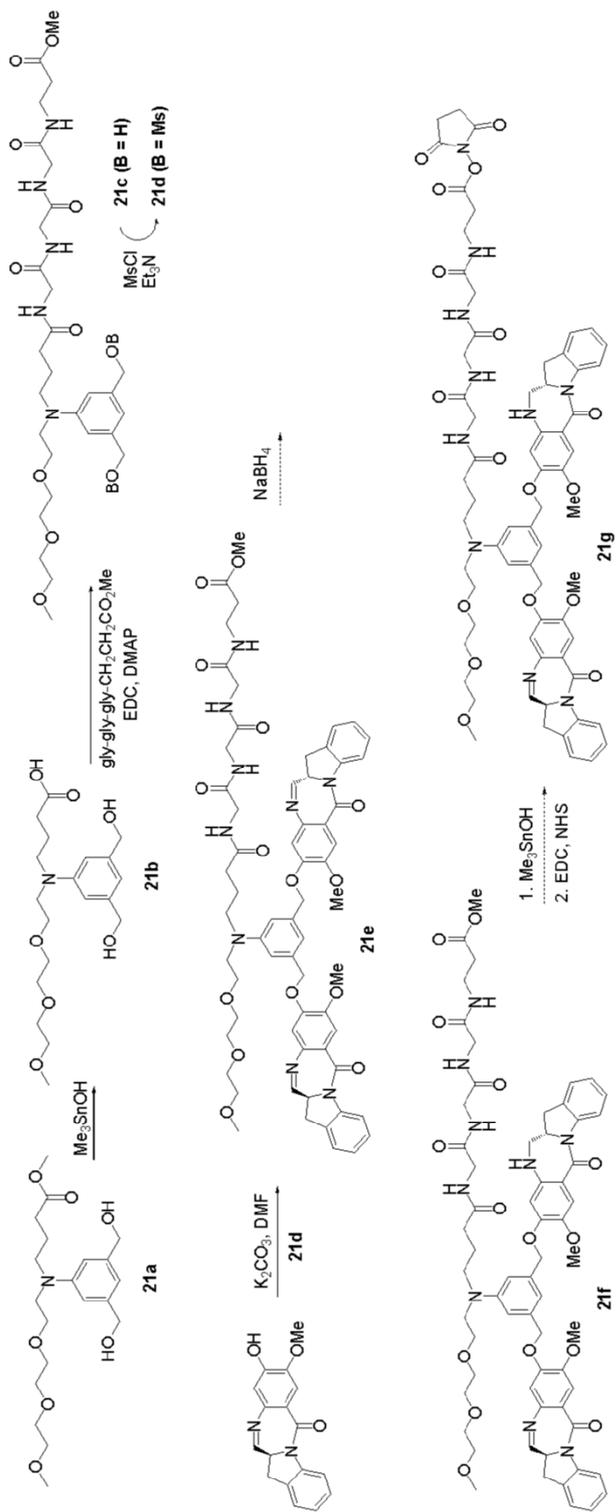


Figura 12B. Esquema alternativo de síntesis de los dímeros **9a-b** enlazable a tioacetil en una etapa

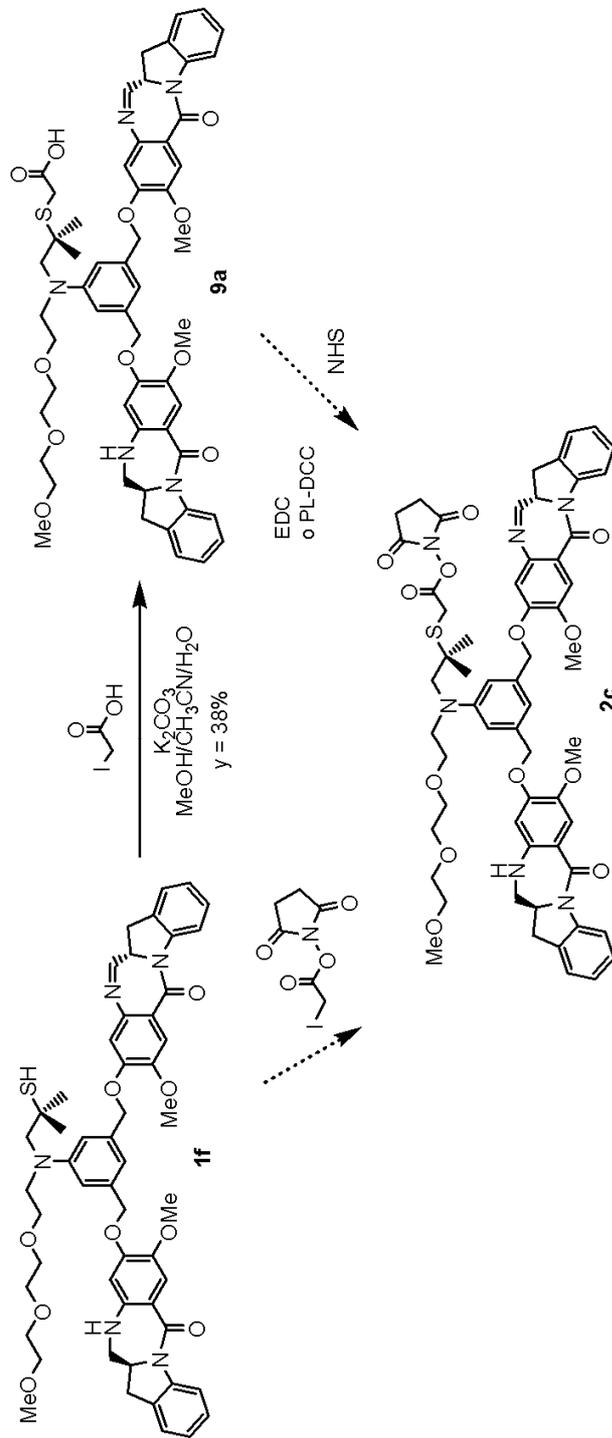


Figura 13. Esquema de síntesis del dímero **10** enlazable a BMPS en una etapa

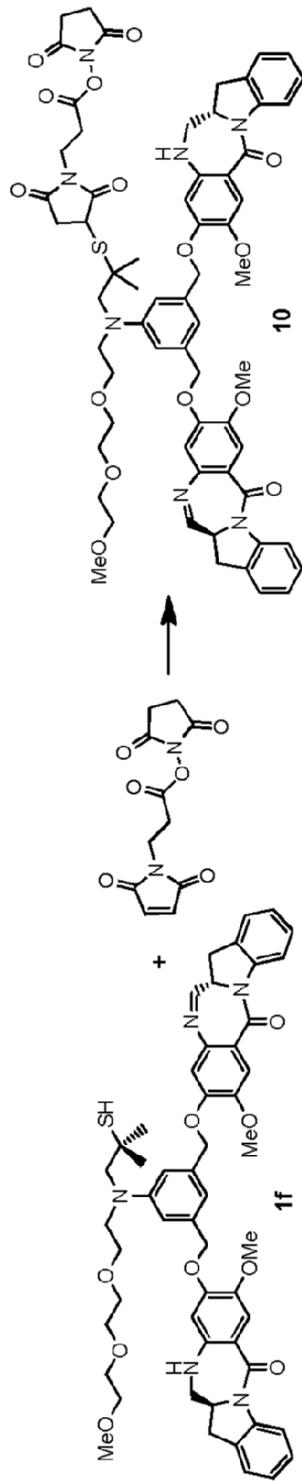


Figura 14. Esquema de síntesis del dímero **11** enlazable a SMCC en una etapa

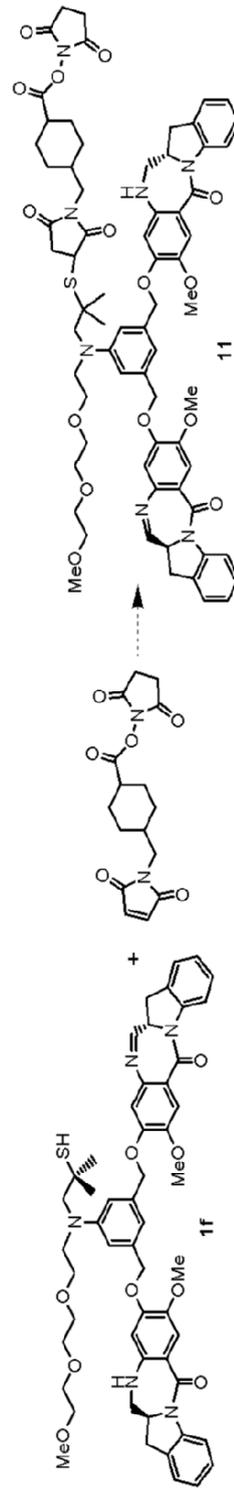


Figura 15. Esquema de síntesis del dímero **12** enlazable a **sulfo-SPDB** en una etapa

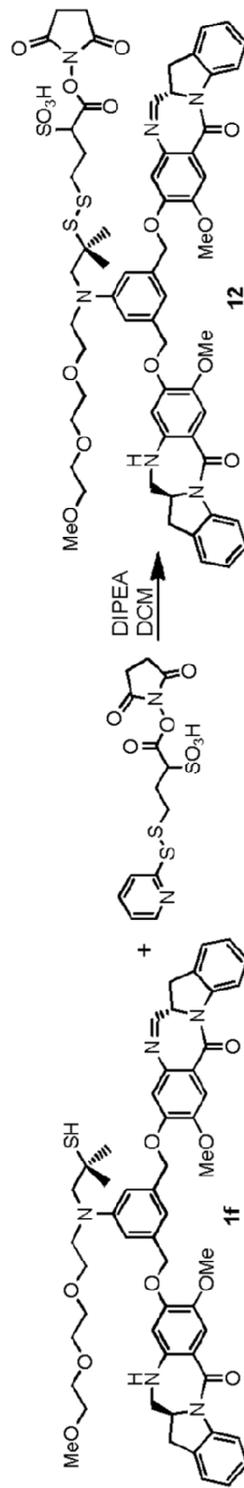


Figura 16. Esquema de síntesis del dímero **13** enlazable a **SPP** en una etapa

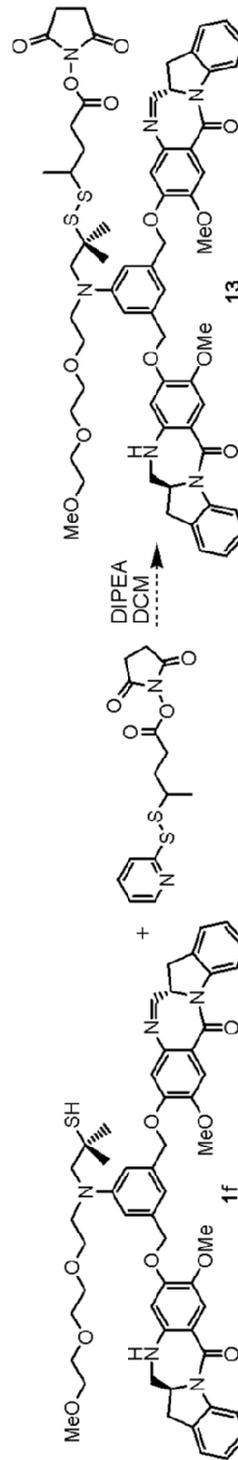


Figura 17. Esquema de síntesis de los dímeros **14a-b** enlazables a tioacetil en una etapa

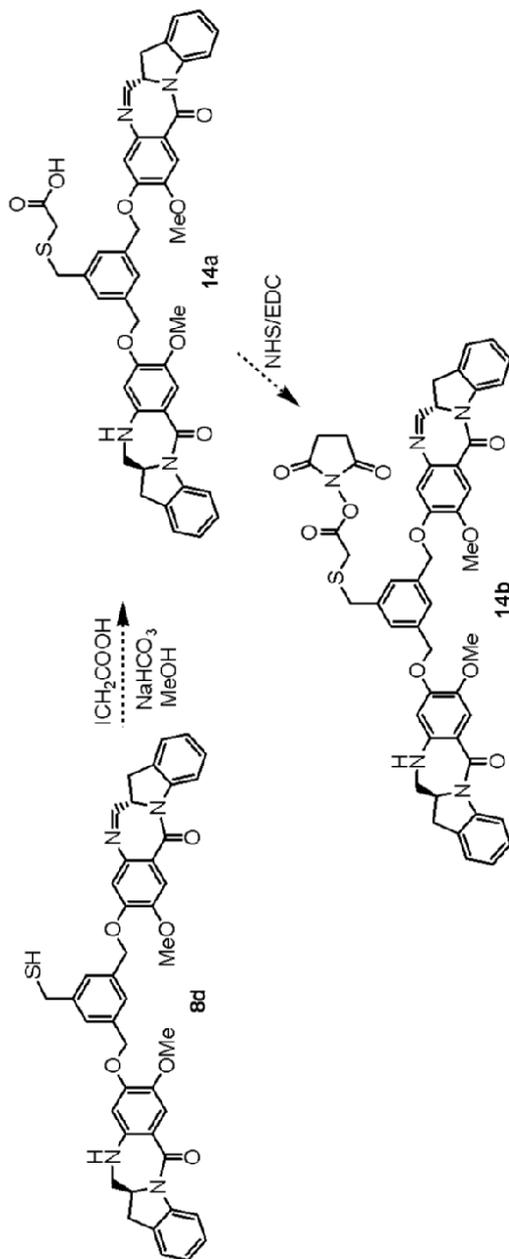


Figura 18. Esquema de síntesis del dímero **15** enlazable a BMPS en una etapa

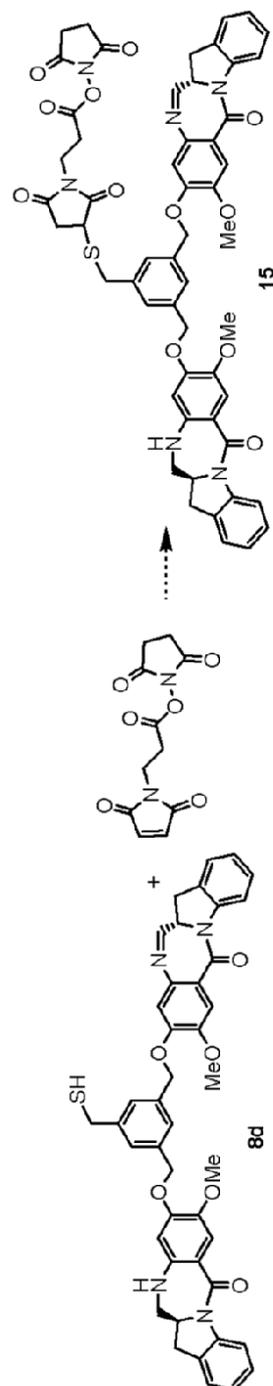


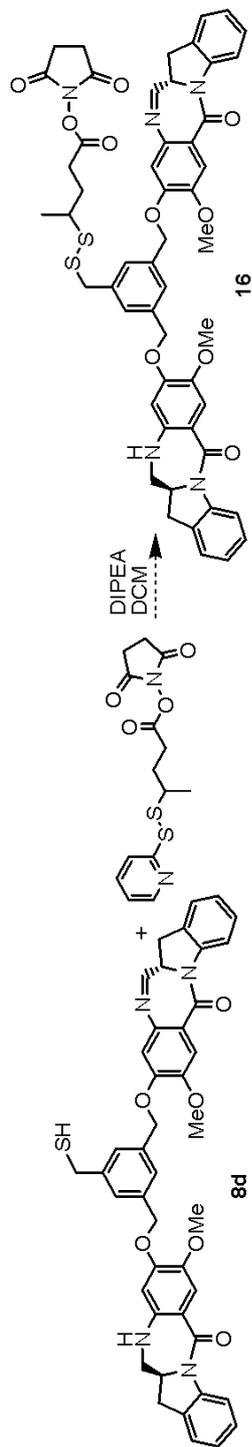
Figura 19. Esquema de síntesis del dímero **16** enlazable a **SPP** en una etapa

Figura 20. Esquema de síntesis de un dímero con mono imina en dos etapas

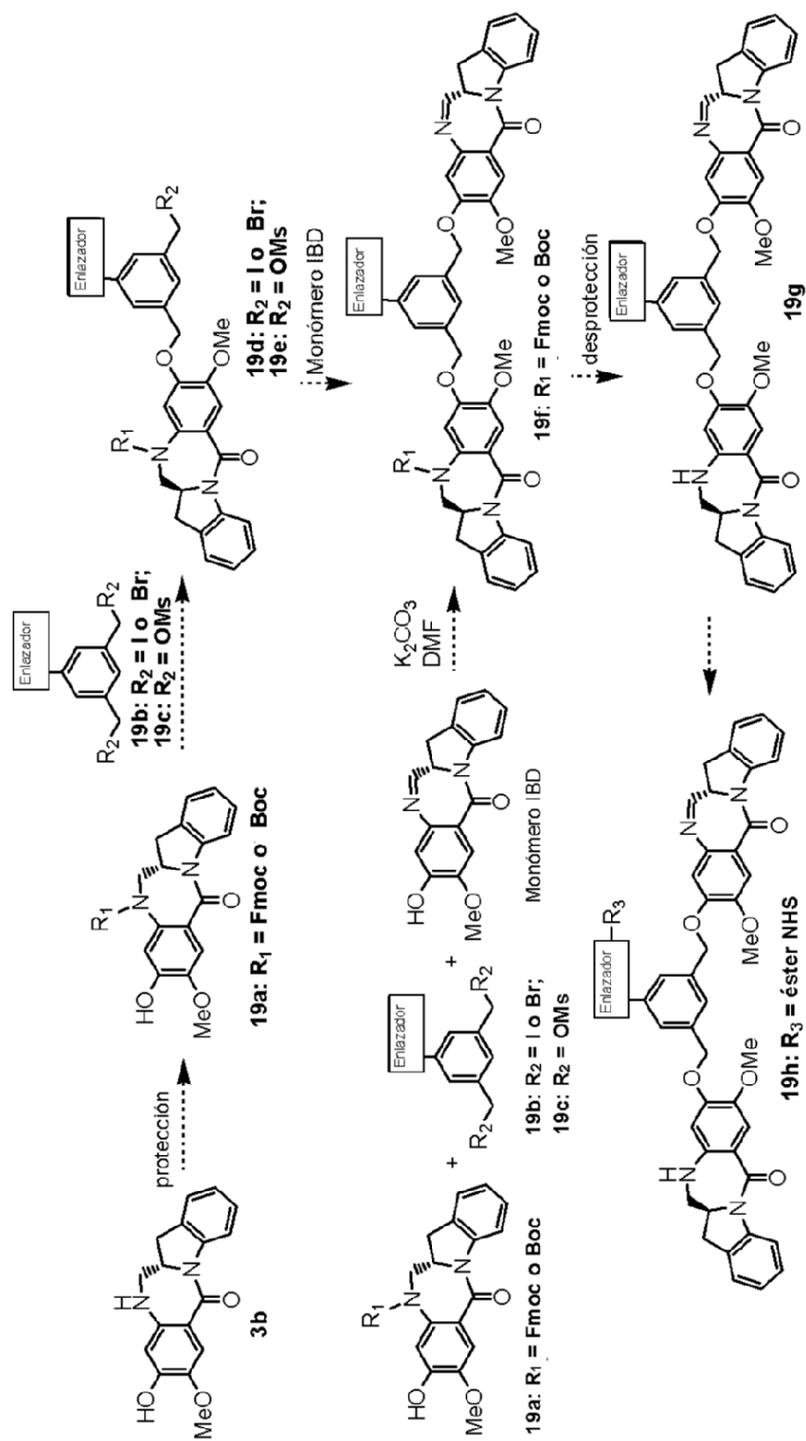


Figura 21. Esquema de síntesis de una síntesis de dímero Di reducido en dos etapas

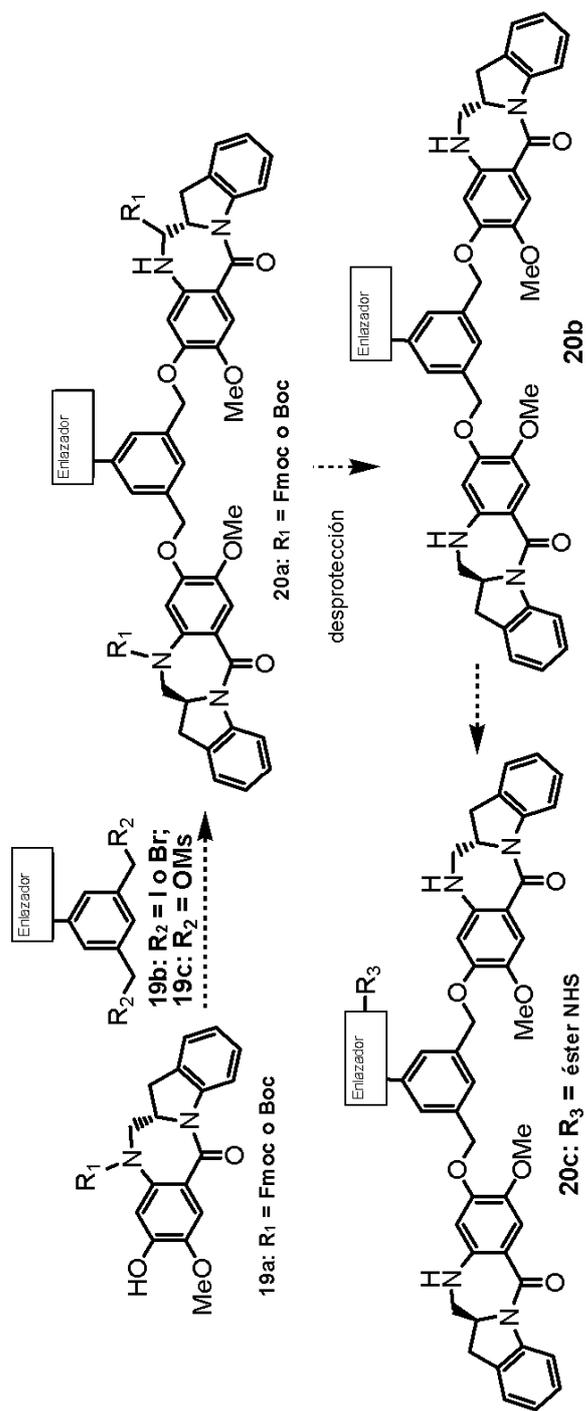


Figura 22. Esquema de conjugación en una etapa

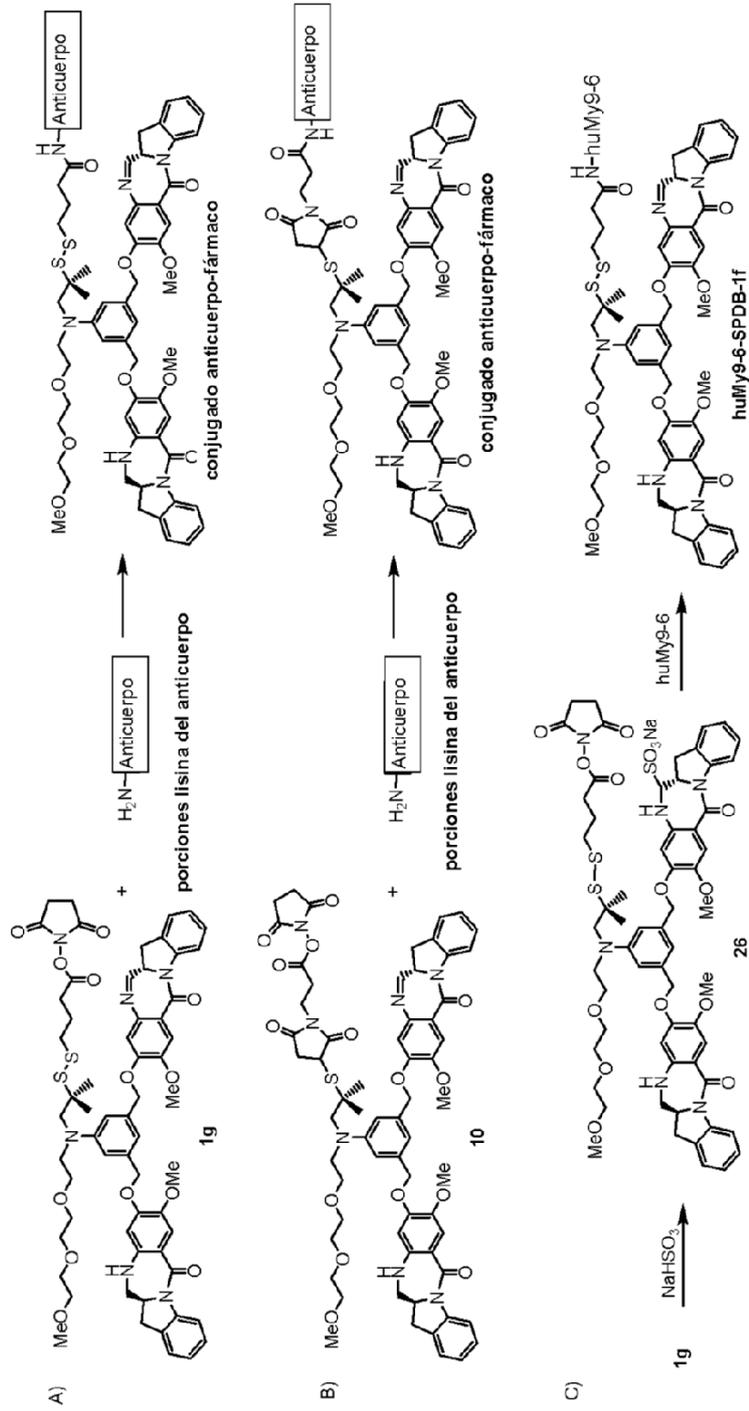


Figura 23. Esquema de conjugación en dos etapas

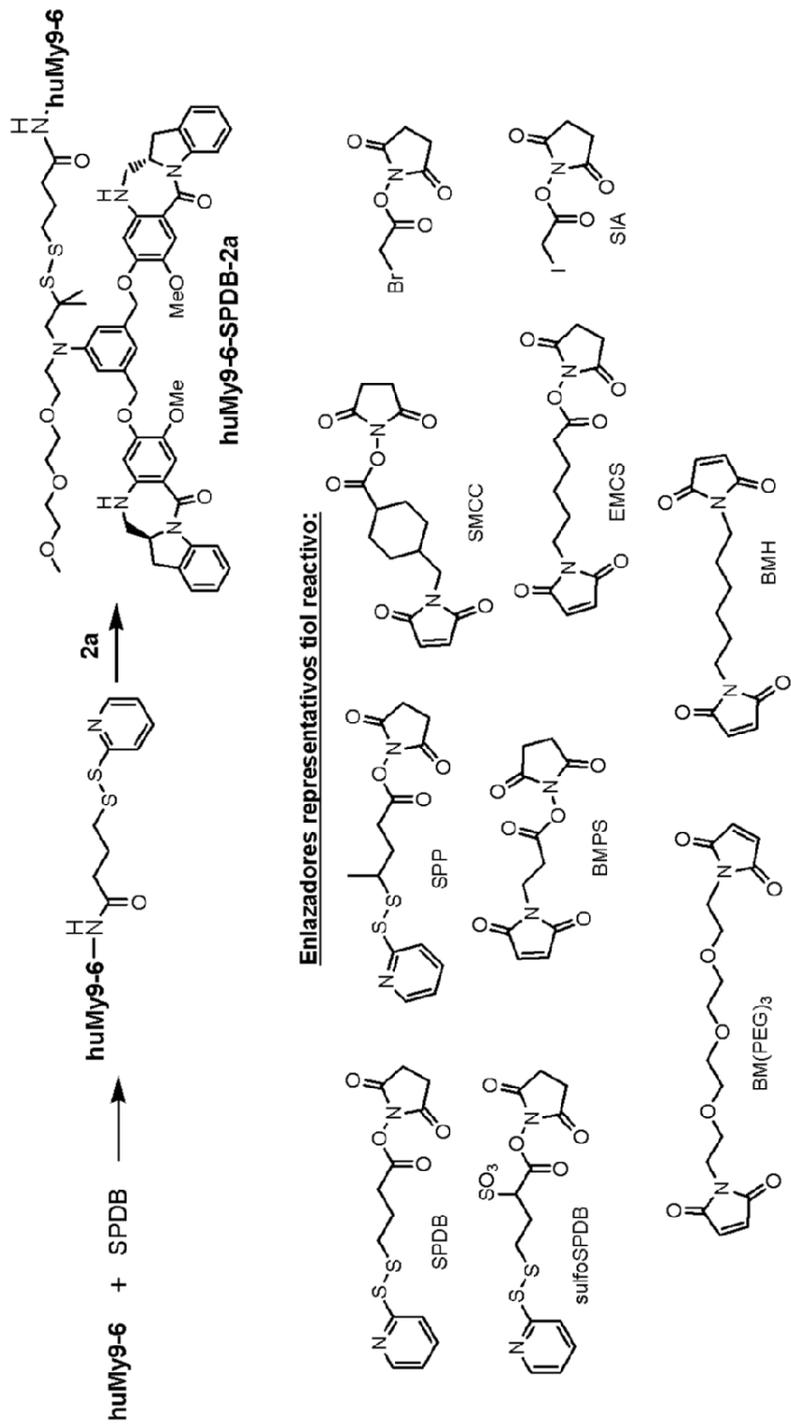


Figura 24. Actividad anti proliferativa del dimero **1d** metiliditio contra (A) células Namalwa, células HL60/QC, y (C) células KB

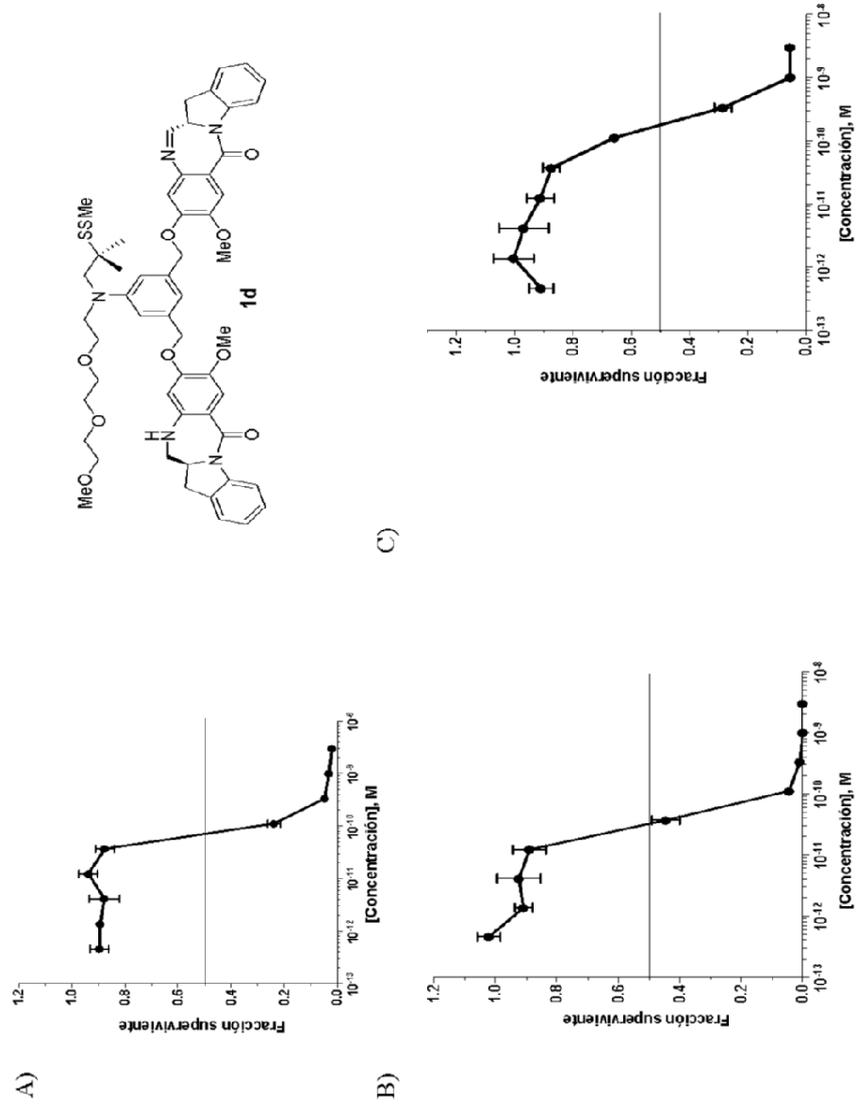


Figura 25. Actividad antiproliferativa de huMY9-6-SPDB-1f contra (A) células HL60/QC, (Ag⁺) con y sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno, (B) células HL60/ATCC (Ag⁺) y (C) células NB-4 (Ag⁺)

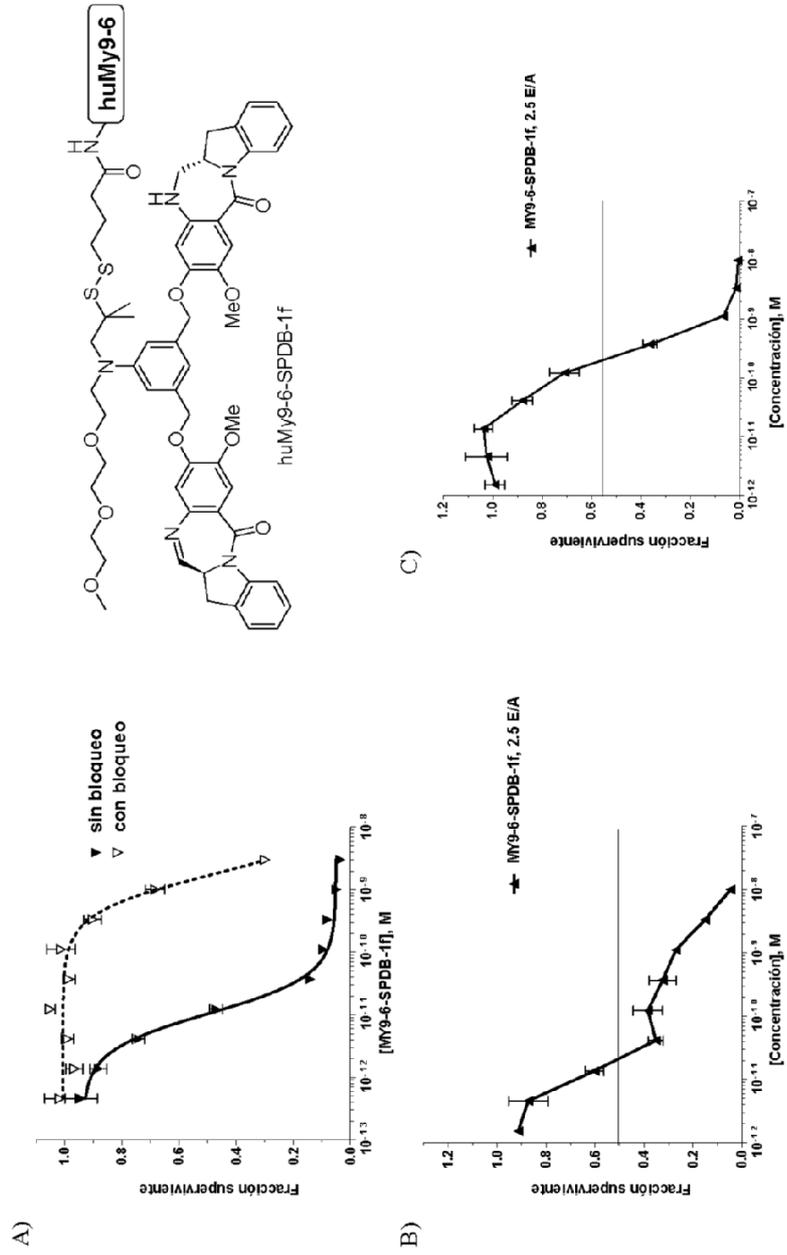


Figura 26. Actividad antiproliferativa de huFOLR1-SPDB-1f contra células KB(Ag⁺) con y sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno

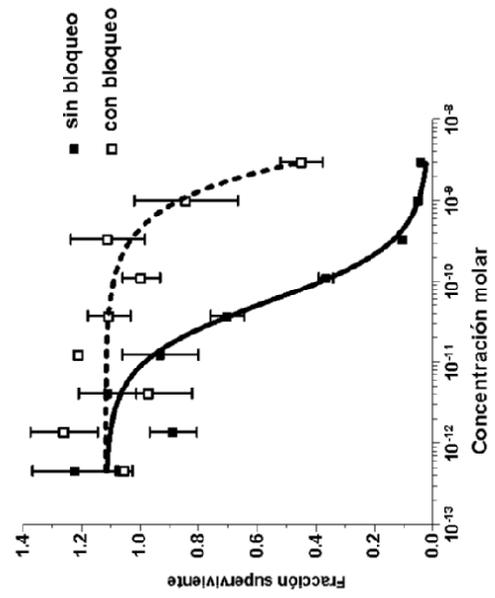
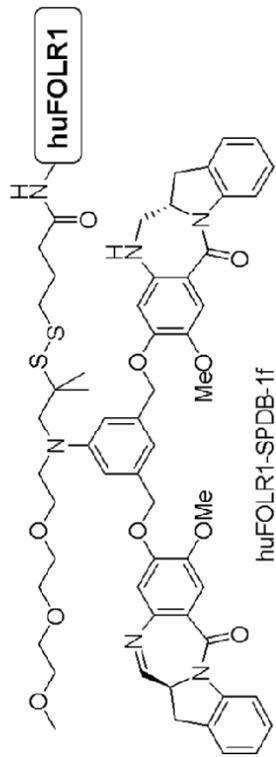


Figura 27. Actividad de unión de huMY9-6-SPDB-1f (Análisis FACS)

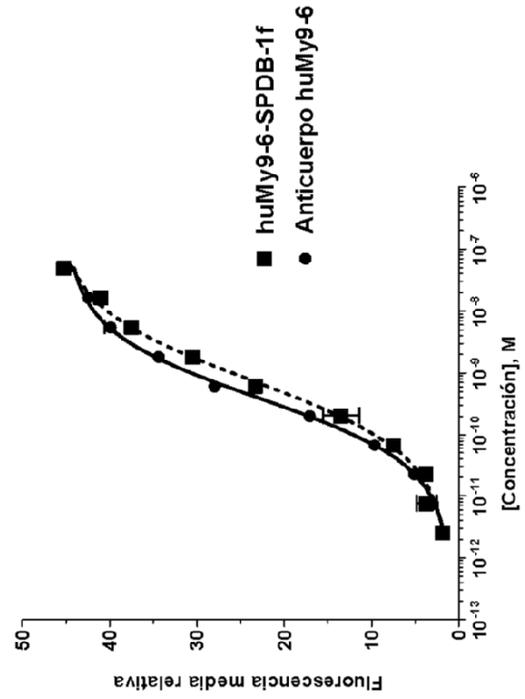
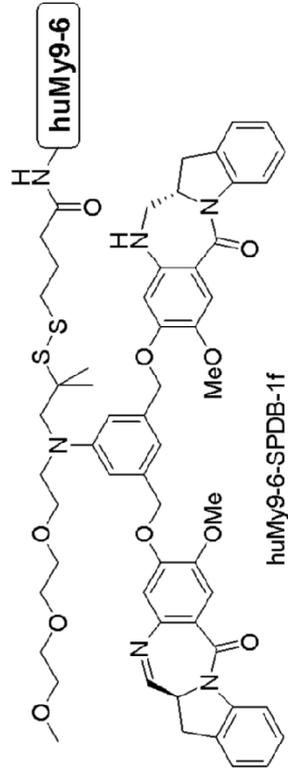


Figura 28. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-1f en ratones desnudos que portan el tumor HL60/QC

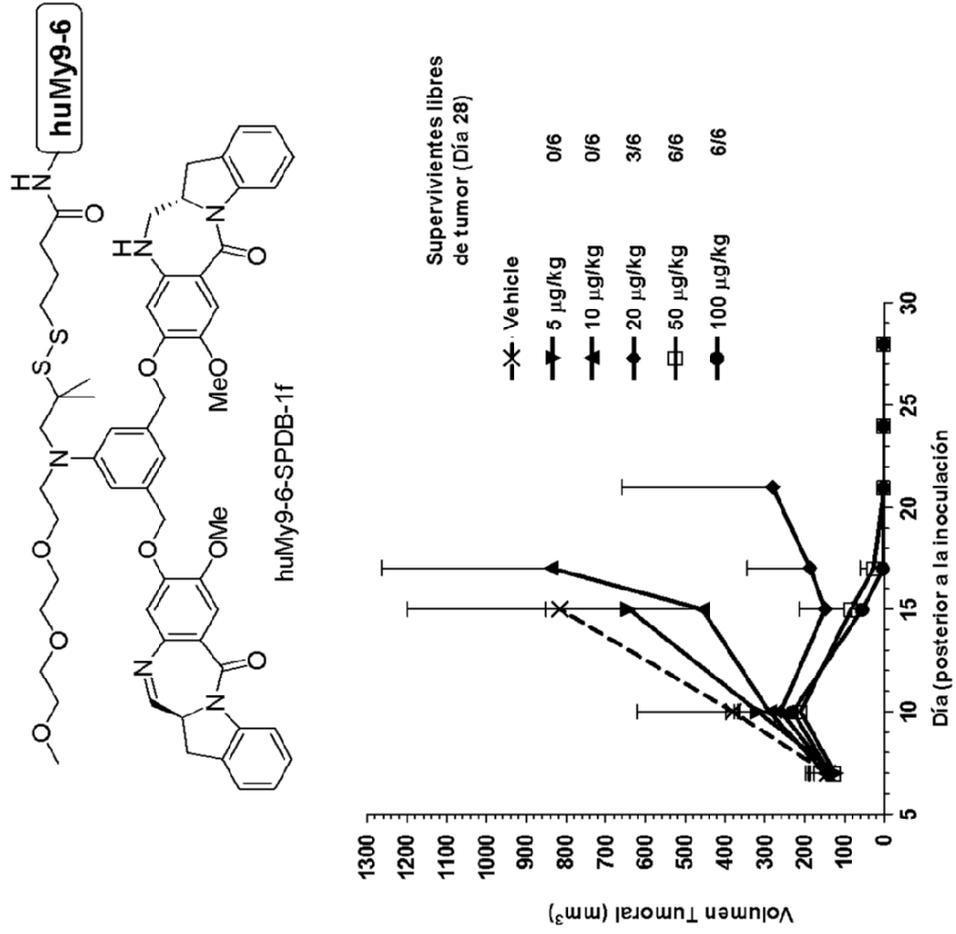
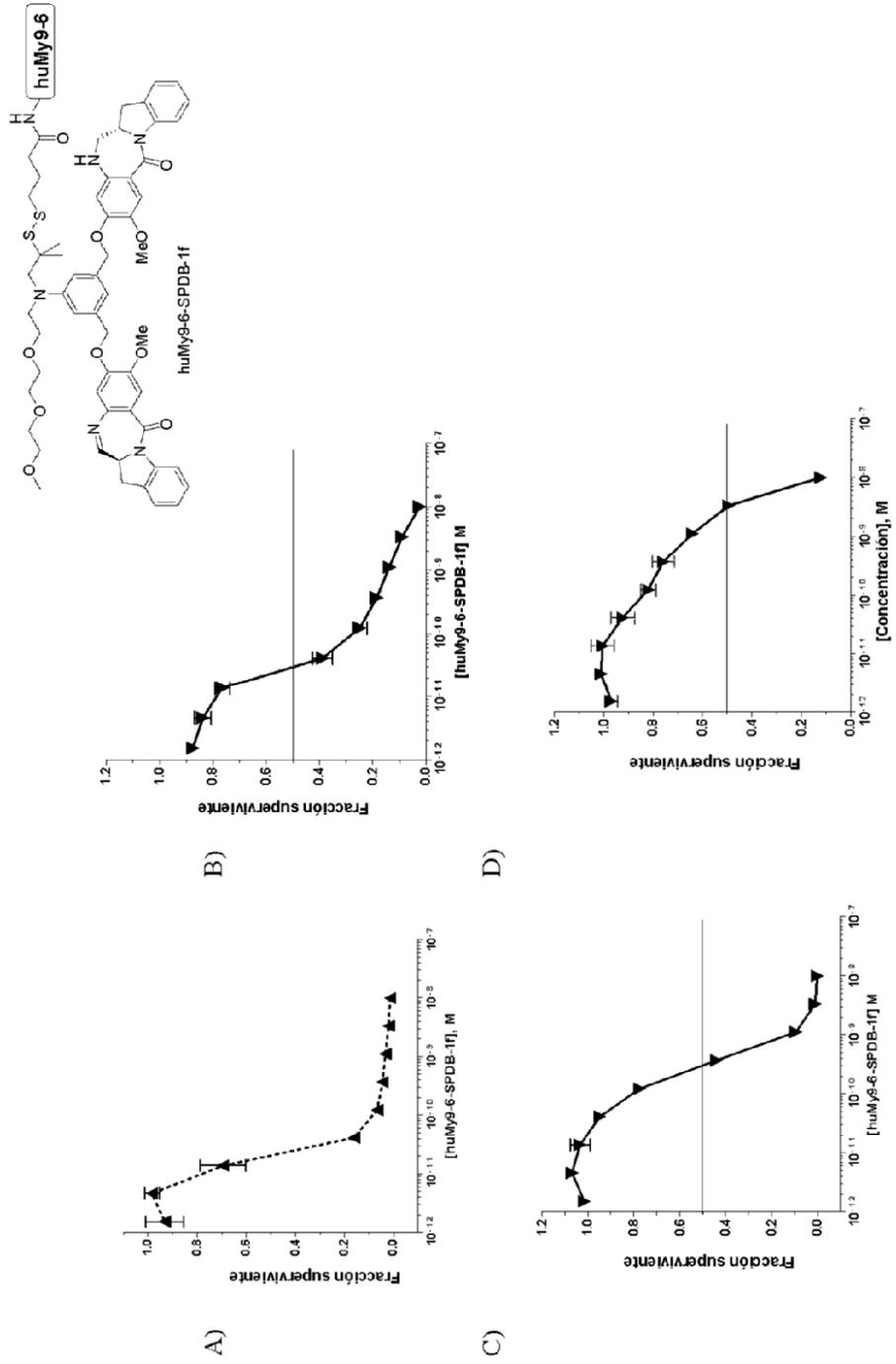


Figura 29. Actividad anti proliferativa de huMy9-6-SPDB-1f contra línea celular positiva al antígeno (A) células HL60/QC, (B) células HL60/ATCC, (C) células NB-4, y (D) células HEL 92.1.7



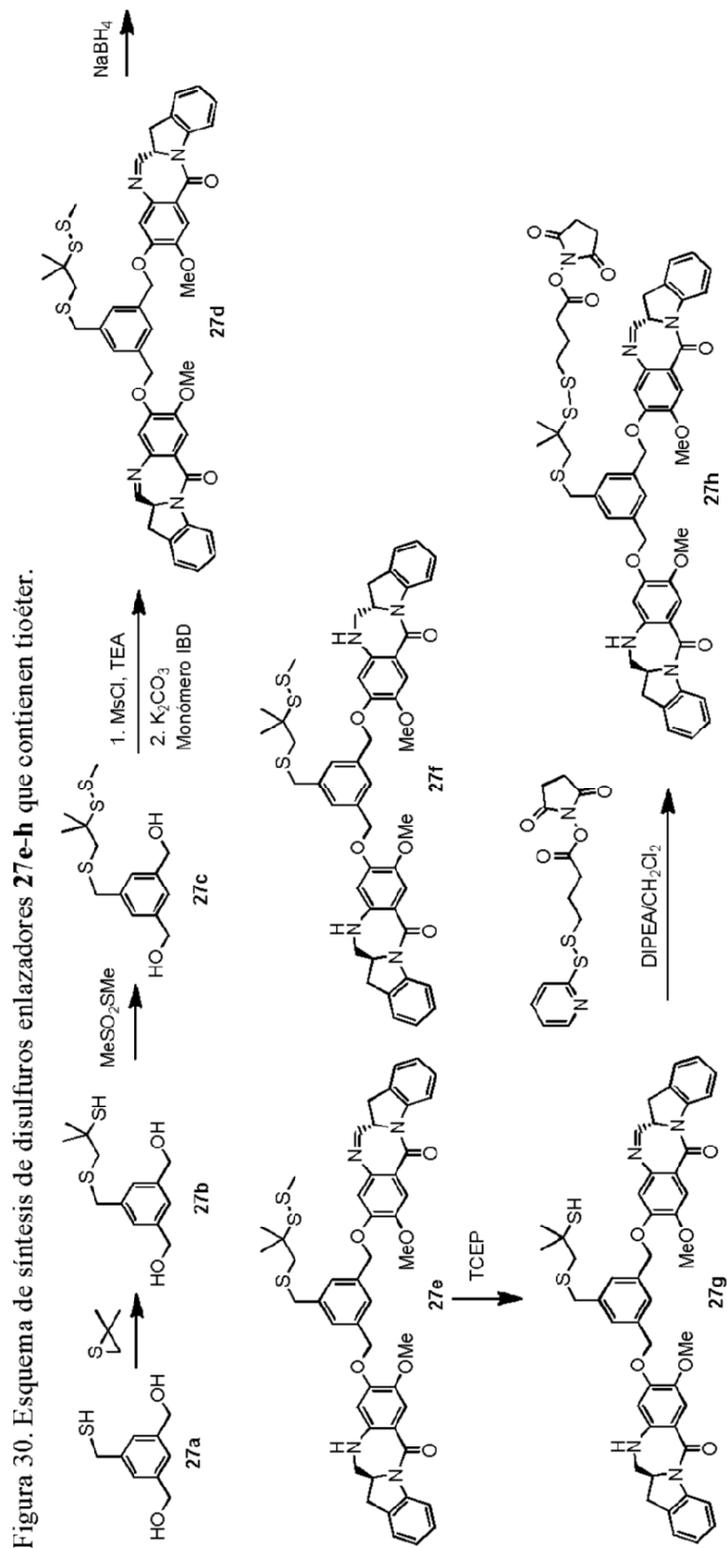


Figura 31. Esquema de síntesis de los dímeros **28c-f**

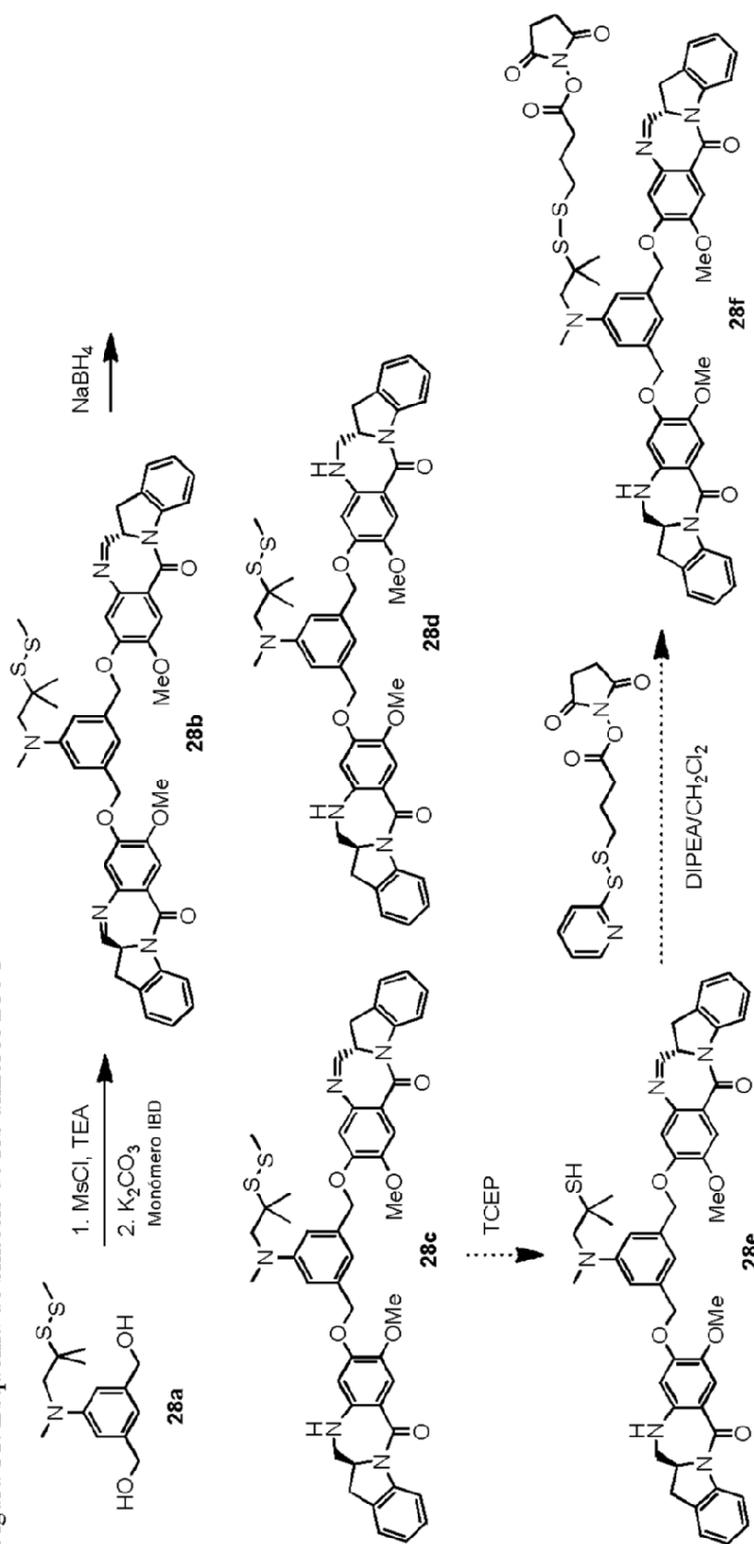


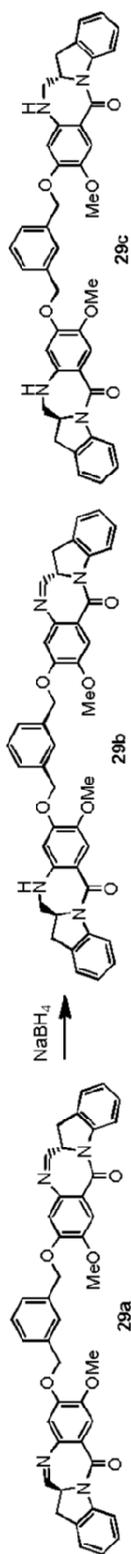
Figura 32. Esquema de síntesis de los dímeros **29b-c** enlazados a fenil

Figura 33. Síntesis alternativa de dímero mono-imina en dos etapas

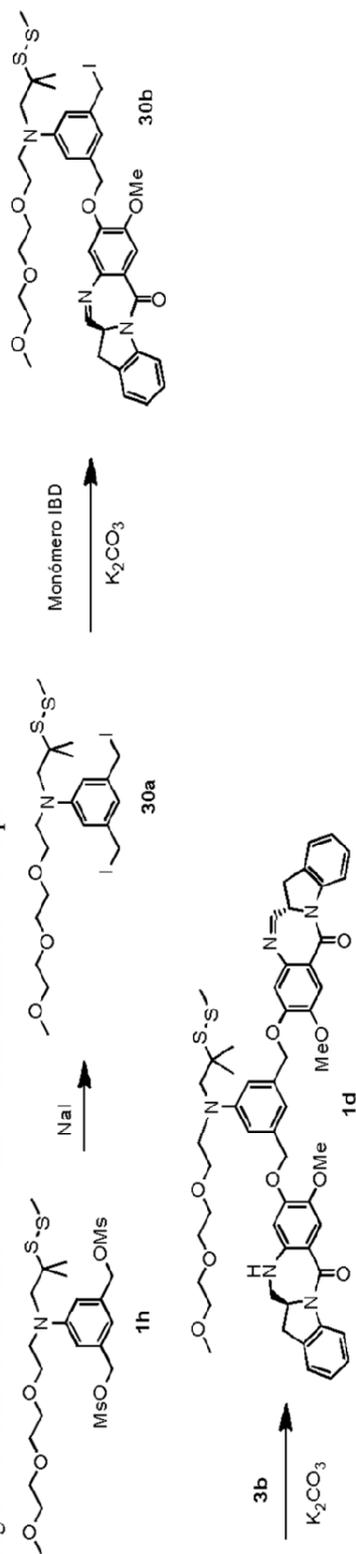


Figura 34. Actividad antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-1f, y (B) huMy9-6-sulfosPDB-1f, y (C) huMy9-6-EMPS-1f contra células HL60/QC (Ag^T) con o sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno

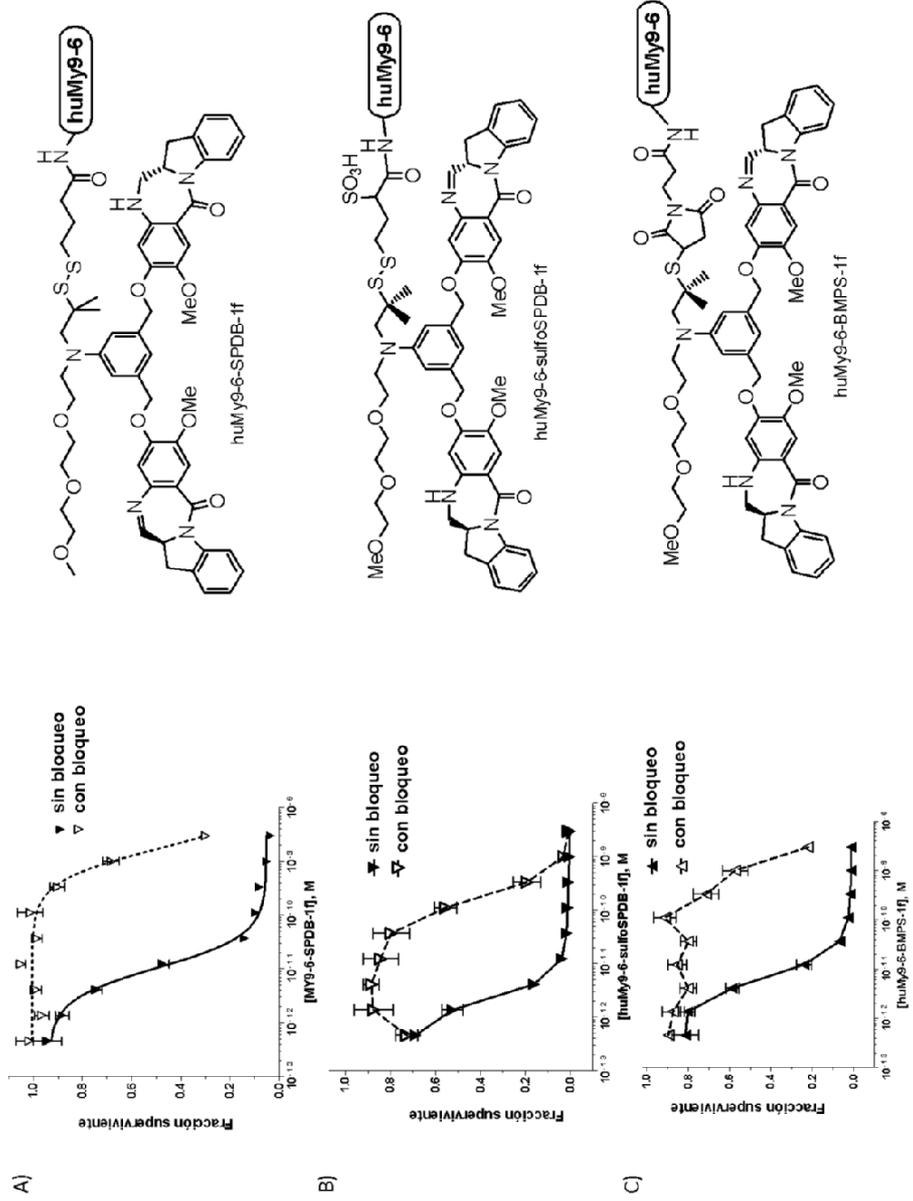


Figura 35. Actividad antiproliferativa comparando (A) chB38.1-SPDB-1f, y (B) chB38.1-sulfoSPDB-1f, contra células COLO205 (A₆₇₃)

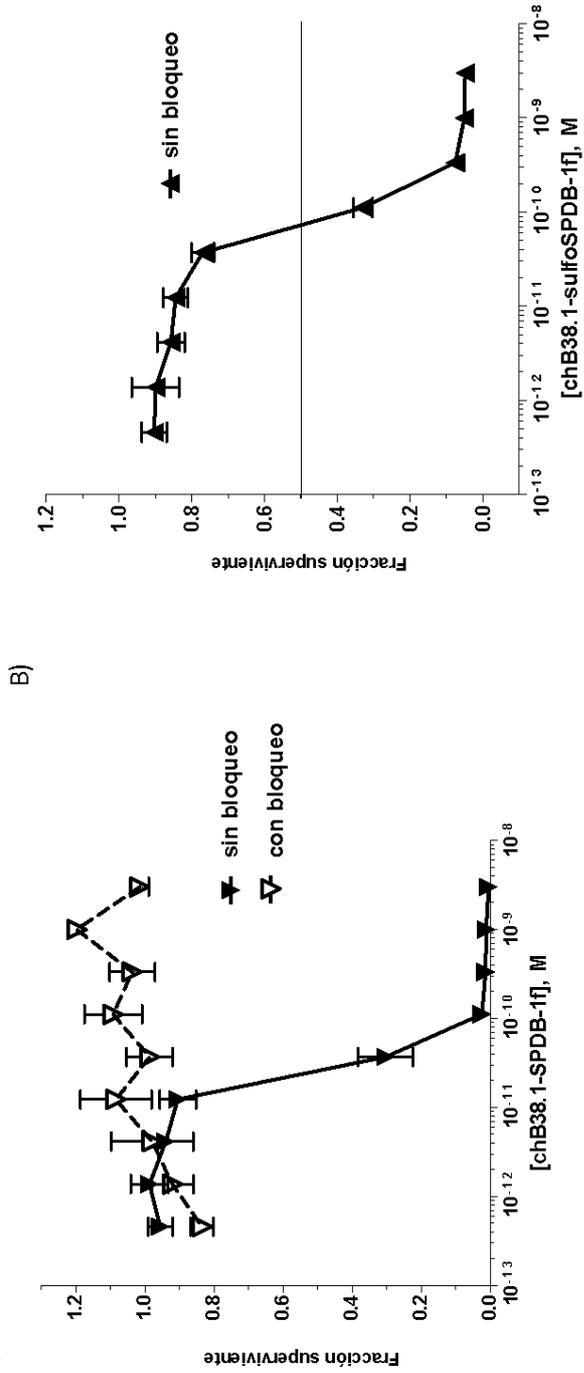


Figura 36. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-1f en ratones que portan el tumor HL60/QC

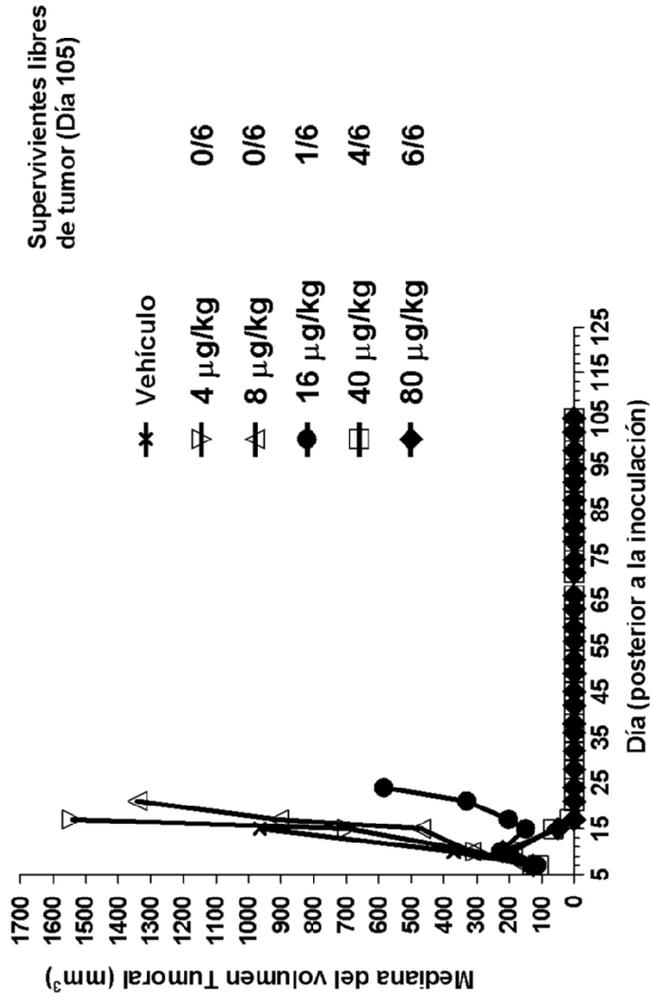


Figura 37. Eficacia *in vivo* de huFOLR1-SPDB-1f en ratones que portan el tumor KB

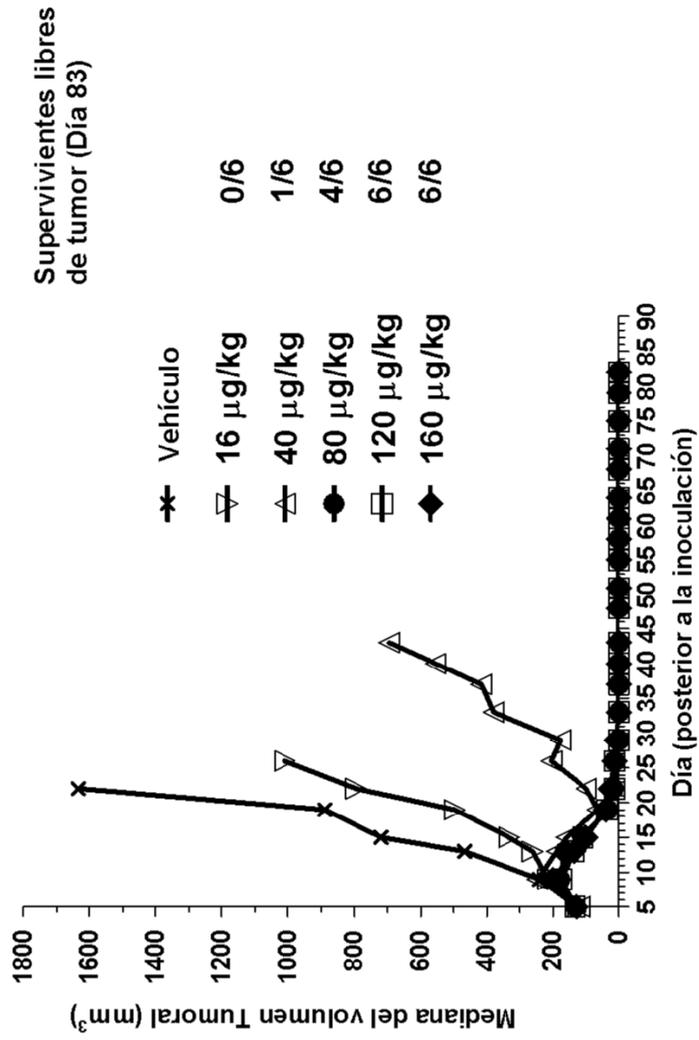


Figura 38. Esquema de síntesis del compuesto **1**

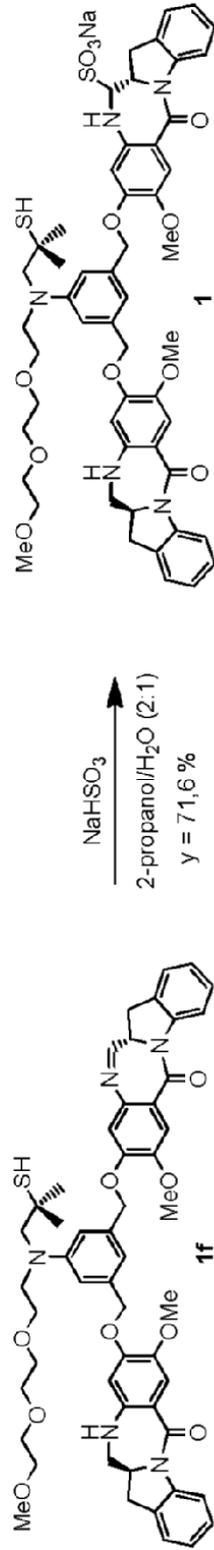


Figura 39. Esquema de síntesis del compuesto **1d** con 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB)

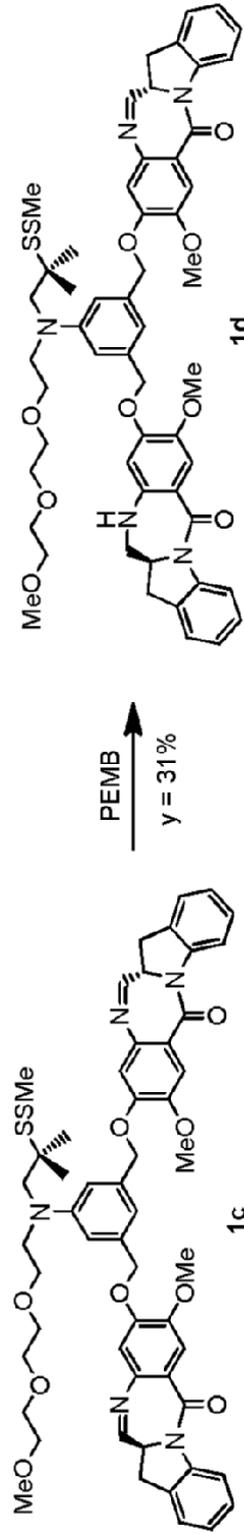


Figura 40. Esquema de síntesis del compuesto **1d** con triacetoxiborohidruro sódico (STAB)

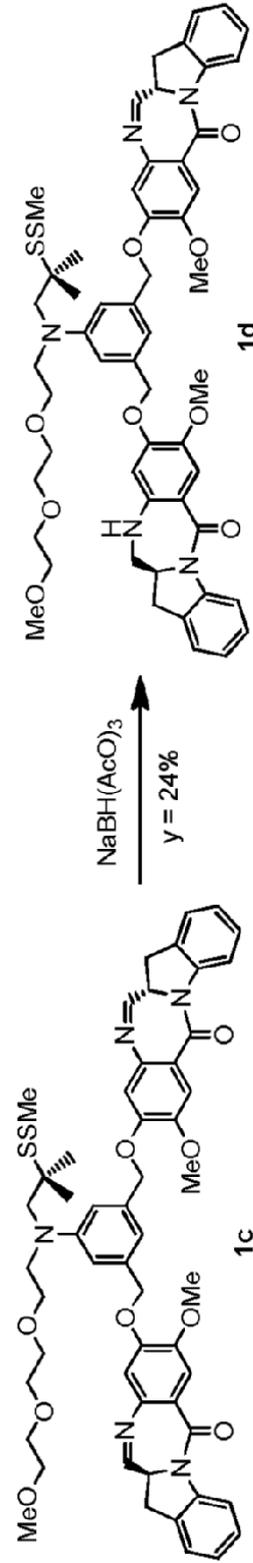


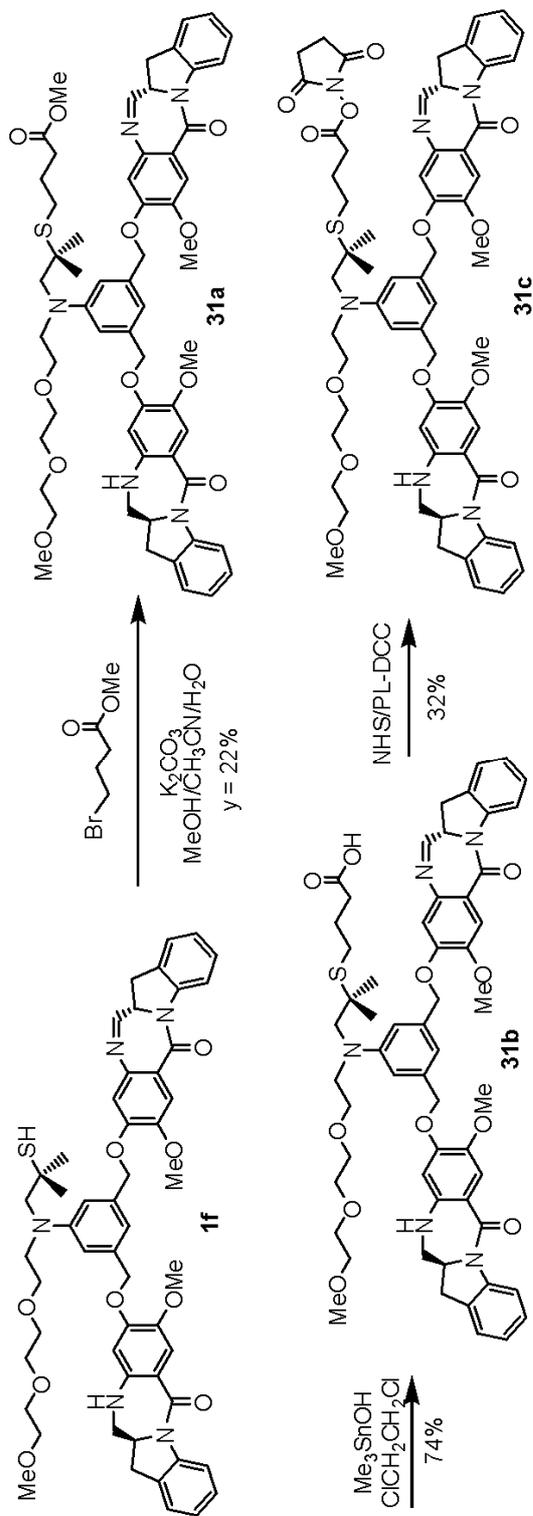
Figura 41. Esquema de síntesis del compuesto **31a-c**.

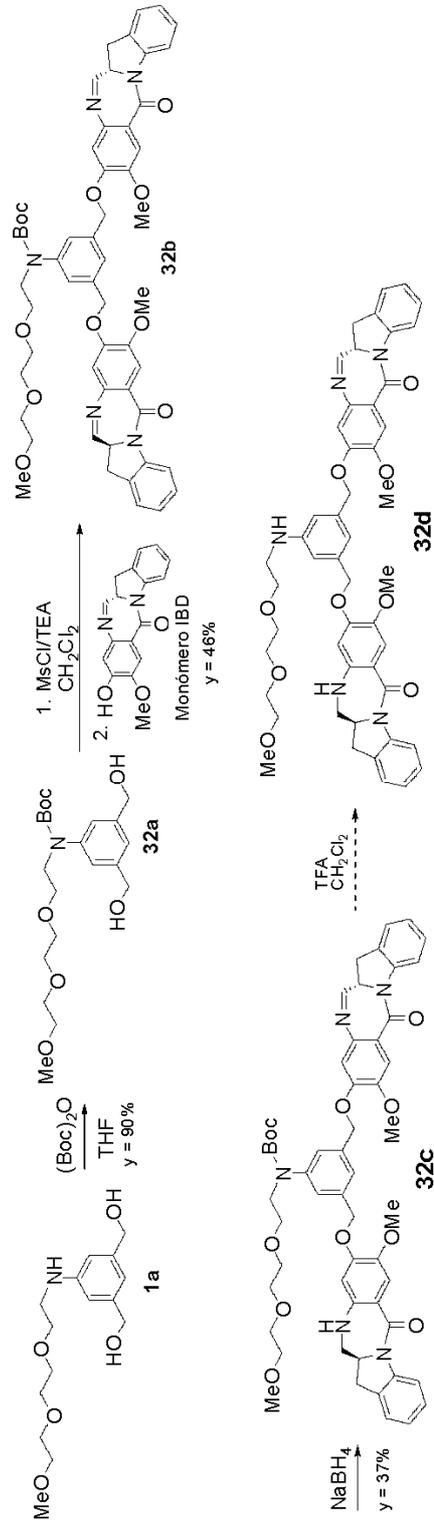
Figura 42. Esquema de síntesis del compuesto **32d**.

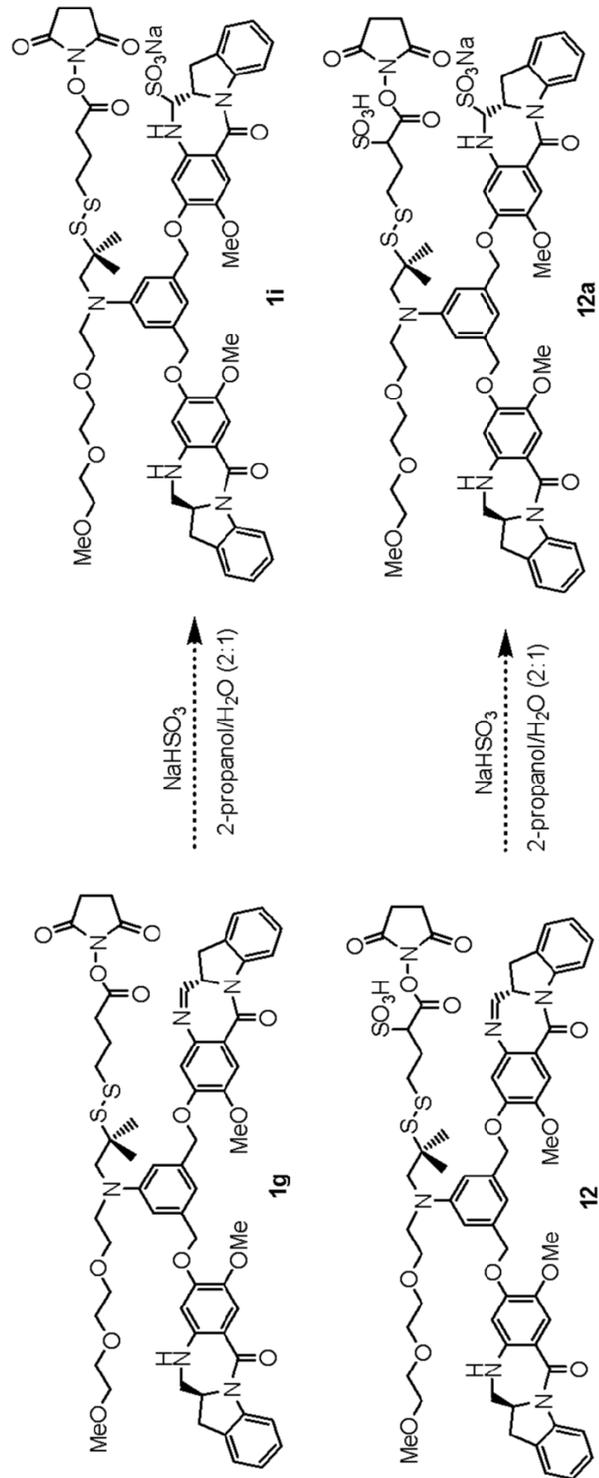
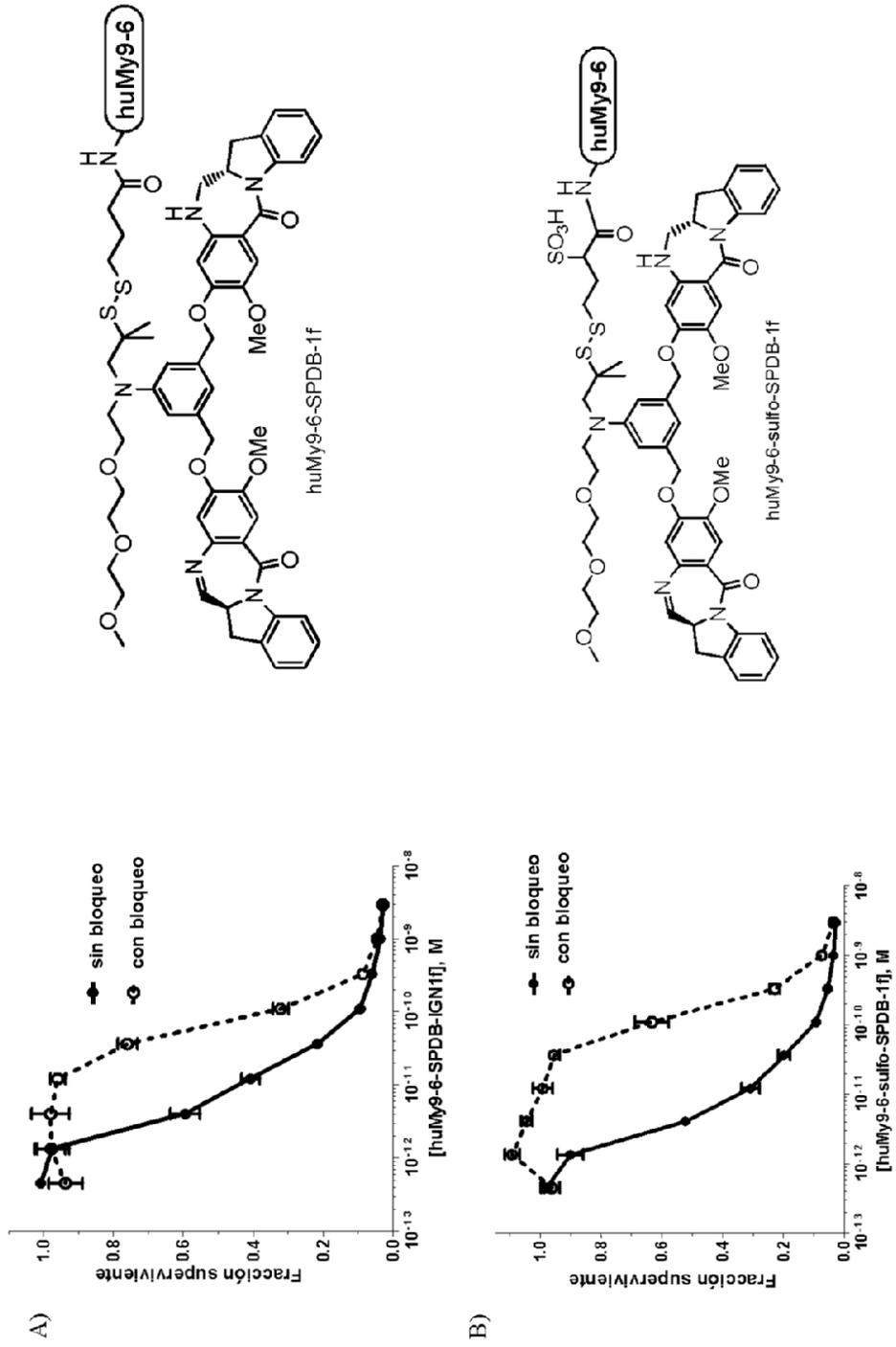
Figura 43. Esquema de síntesis de los compuestos **1i** y **12a**

Figura 44. Actividad antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-1f, y (B) huMy9-6-sulfoSPDB-1f, y (C) huMy9-6-BMPS-1f contra las células OCI-AML3 (Ag⁺) con y sin bloqueo de los sitios de unión al antígeno



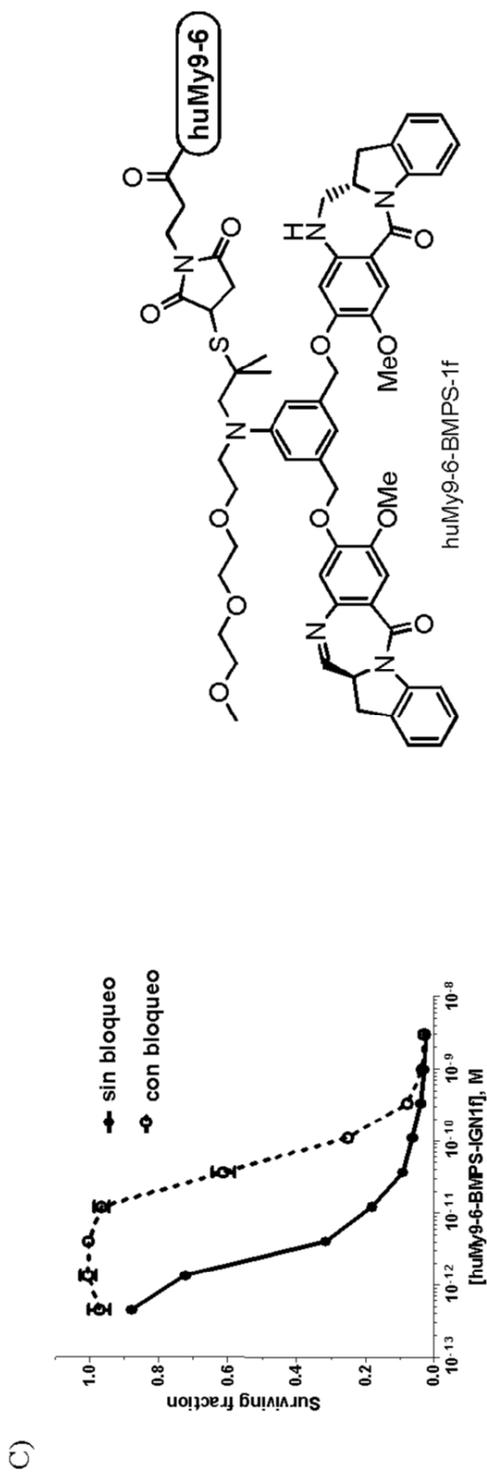


Figura 45. Síntesis alternativa del ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico usado en la preparación del monómero IBD

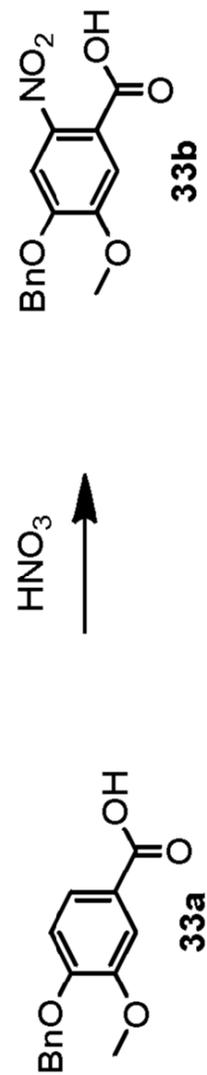


Figura 46. Síntesis alternativa de (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (1b)

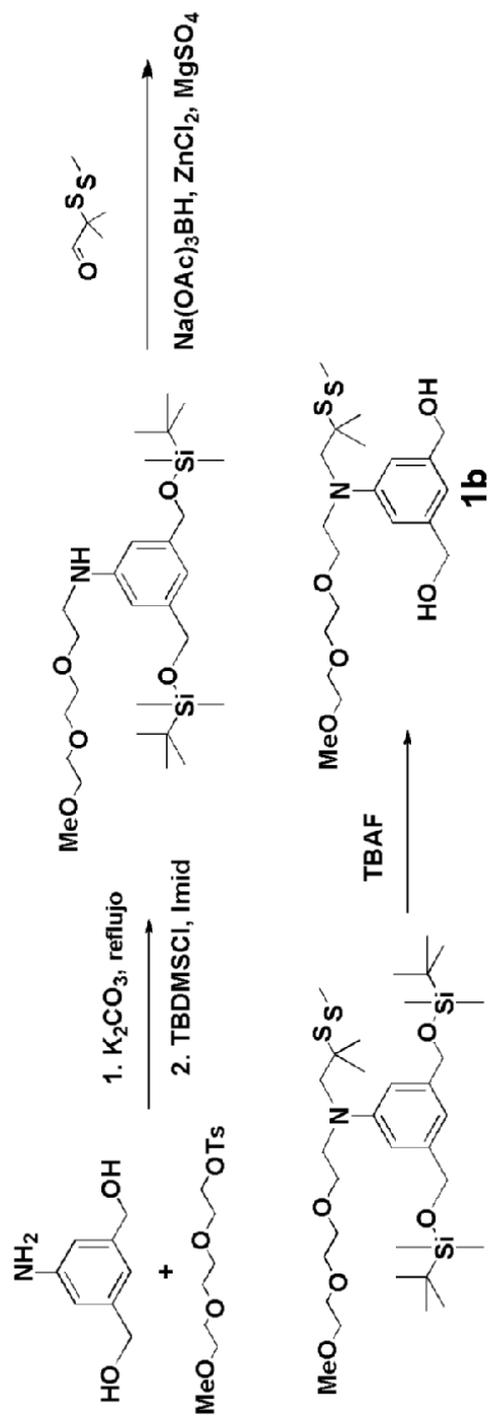


Figura 47. Síntesis alternativa de (5-((2-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)etil)(2-metil-2-(metildisulfanil)propil)amino)-1,3-fenileno)dimetanol (1b)

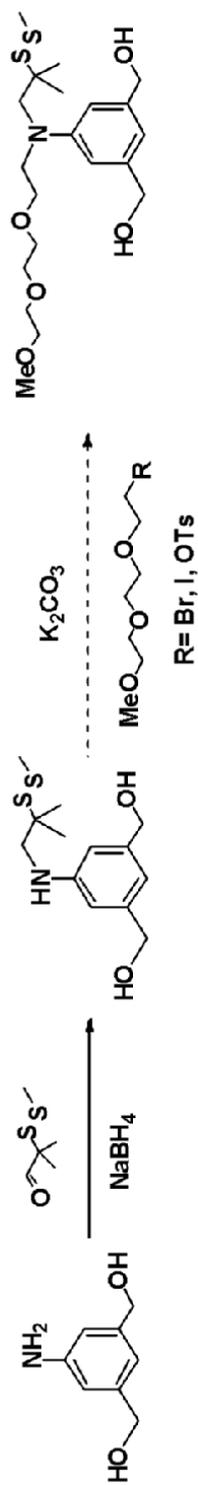


Figura 48. Esquema de síntesis alternativa de una síntesis de dímero mono-imina en dos etapas.

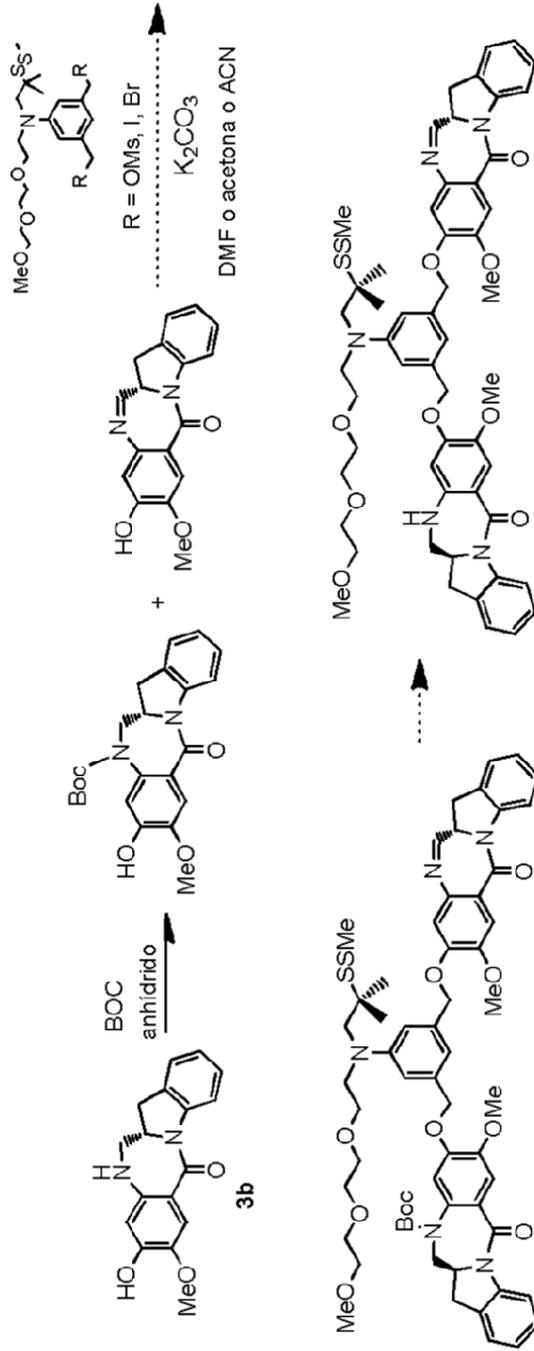


Figura 49. Potencia de conjugados contra diversas líneas celulares medidas por valores CI₅₀ (nM).

conjugado	HL60/QC	MOLM-13	NB4	HEL92.1.7	OCI-AML3
huMy9-6-SPDB-1f	0,005	0,003	0,3	0,5	0,01
huMy9-6-sulfo-SPDB-1f	0,006	0,002	0,4	0,05	0,008
huMy9-6-BMPS-1f	0,003	0,001	0,04	0,04	0,003

Figura 50. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13

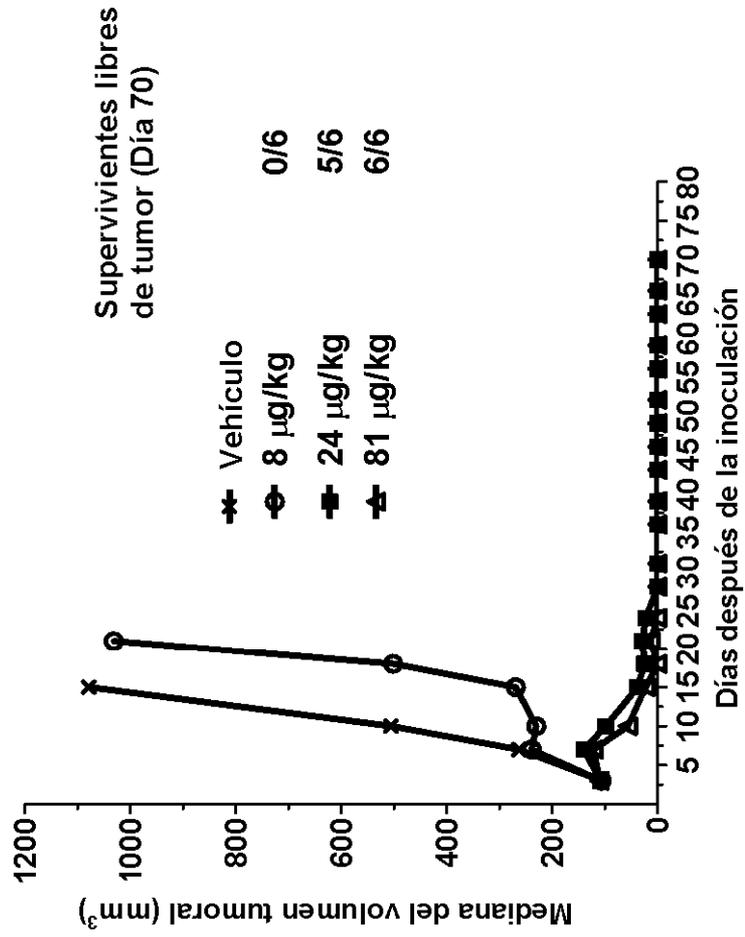


Figura 51. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-sulfo-SPDB-1f en ratones que portan el tumor NB4

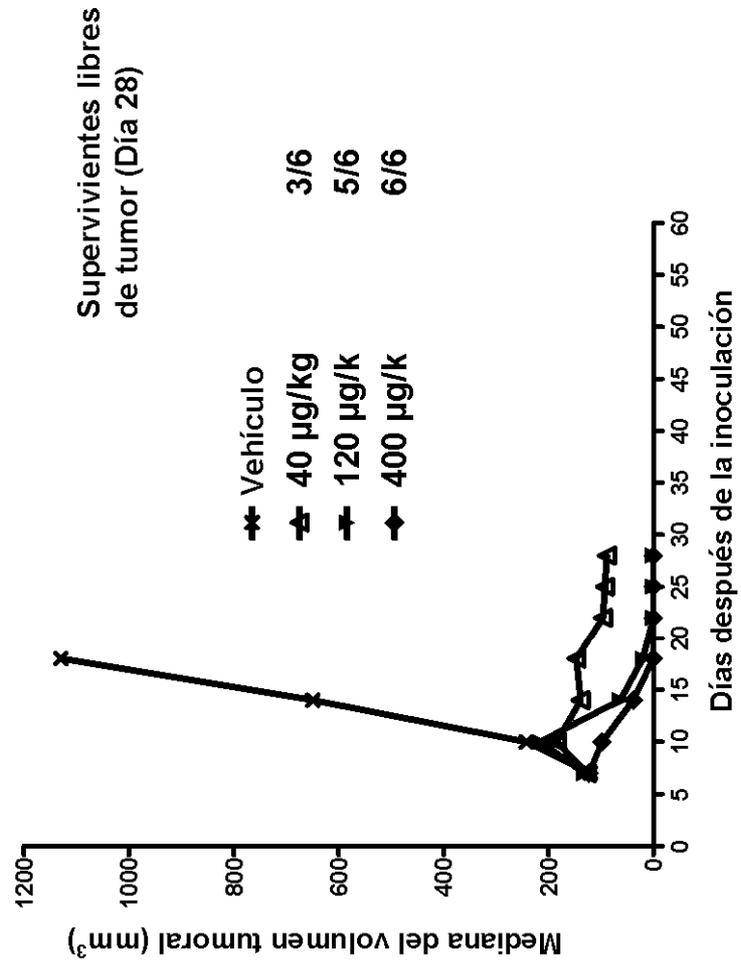


Figura 52. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor HL60/QC

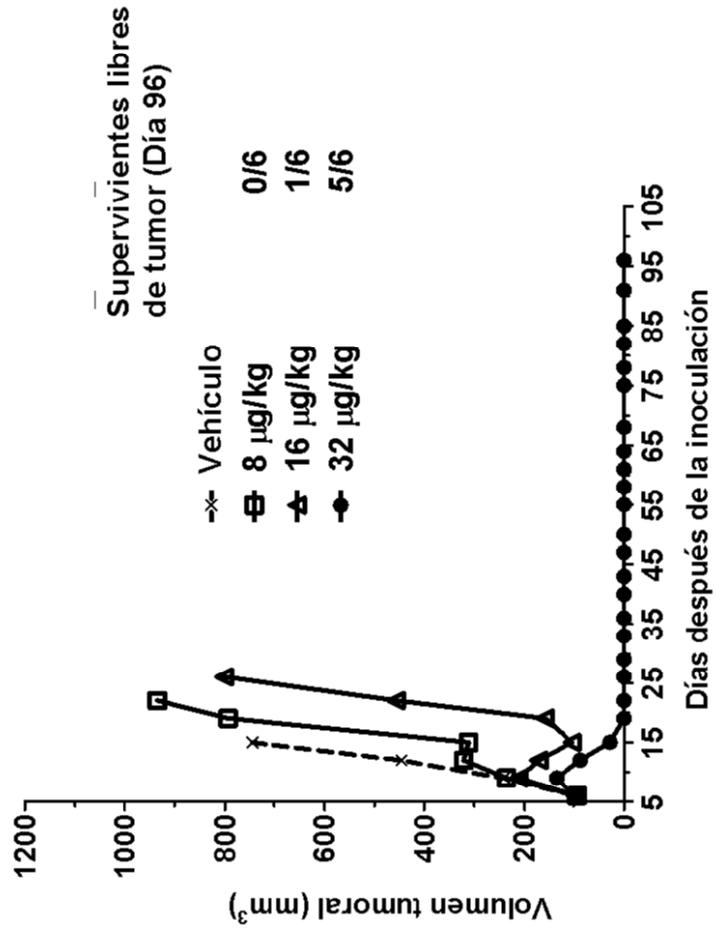


Figura 53. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-1f en ratones que portan el tumor MOLM-13

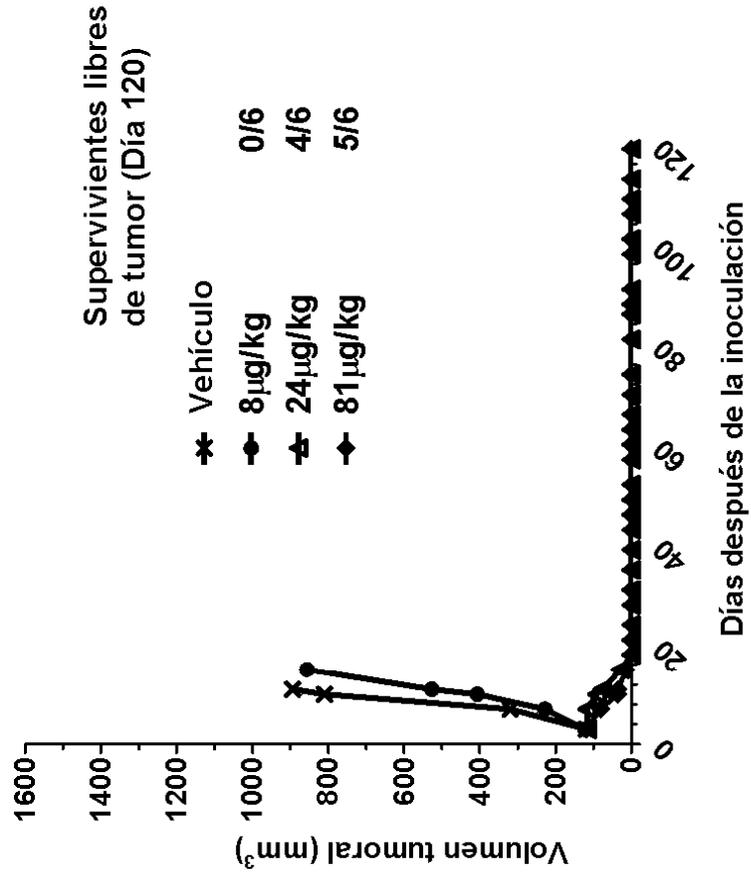


Figura 54. Esquema representativo de la síntesis de un conjugado folato sulfonado/compuesto citotóxico

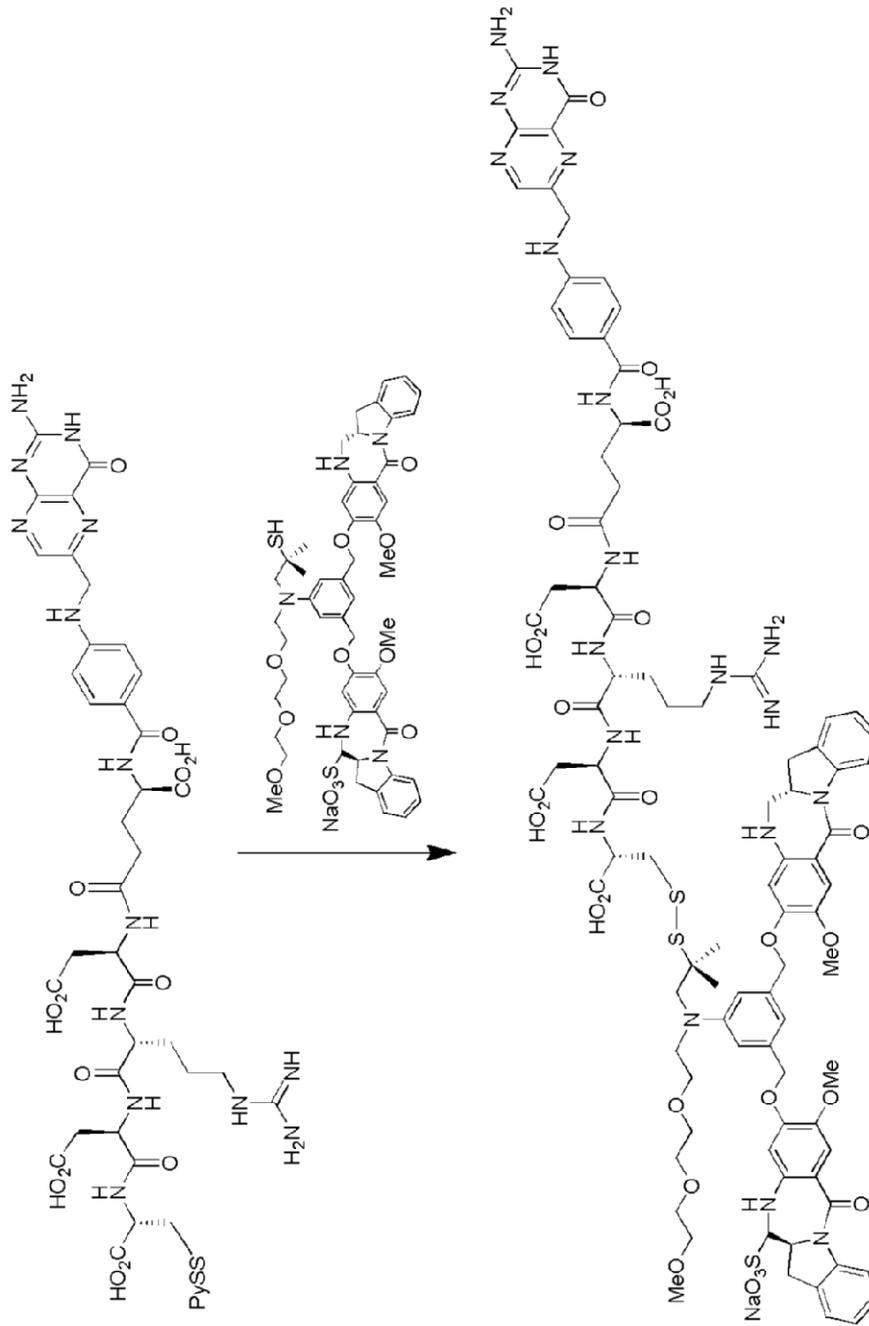


Figura 55. Estructura de varios conjugados fármaco sulfonado-anticuerpo (huMy9-6)

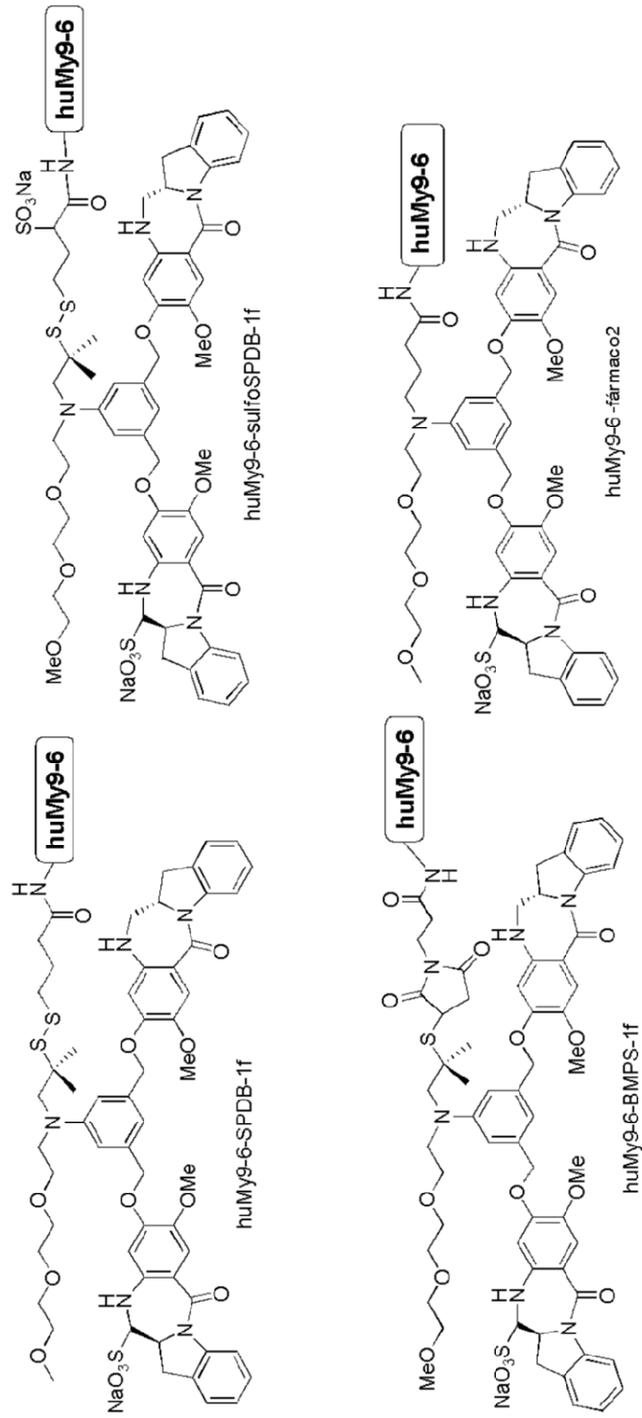


Figura 56. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-fármaco2 en ratones que portan el tumor HL60/QC

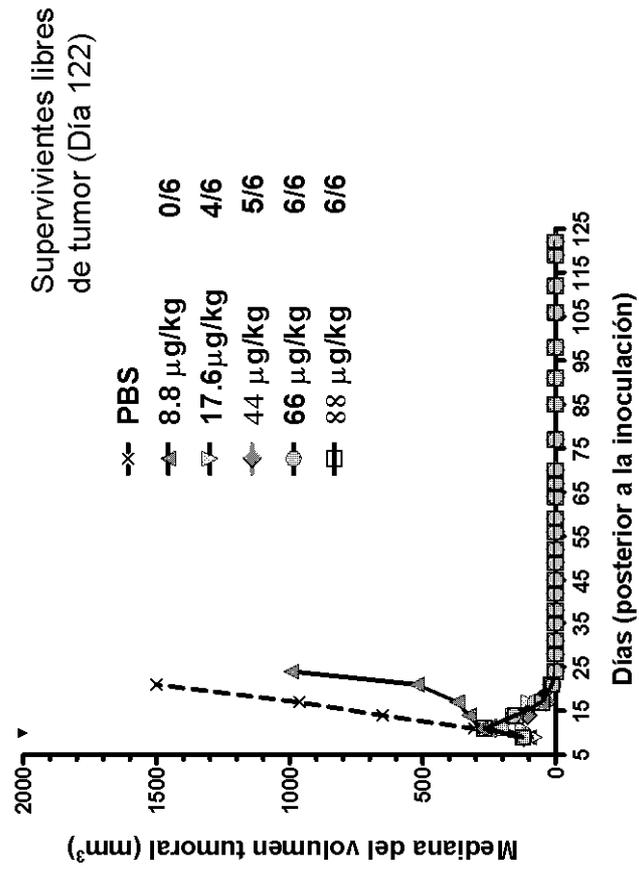


Figura 57. Eficacia *in vivo* de huMy9-6-fármaco2 en ratones que portan el tumor MOLM-13

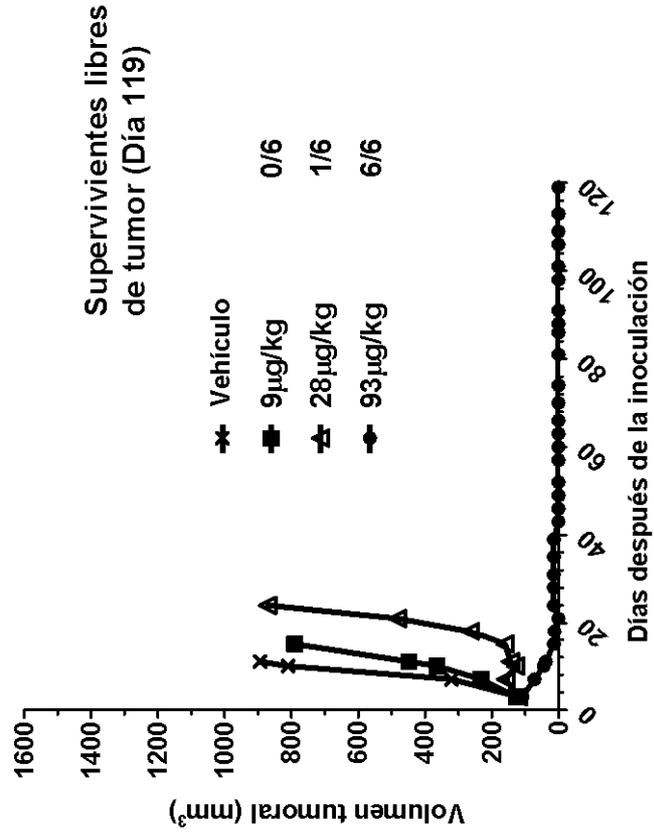


Figura 58 Conjugados huMy9-6-2 preparados sin y con bisulfito de sodio muestran citotoxicidad *in vitro* similar hacia células HL60 que expresan el antígeno CD33

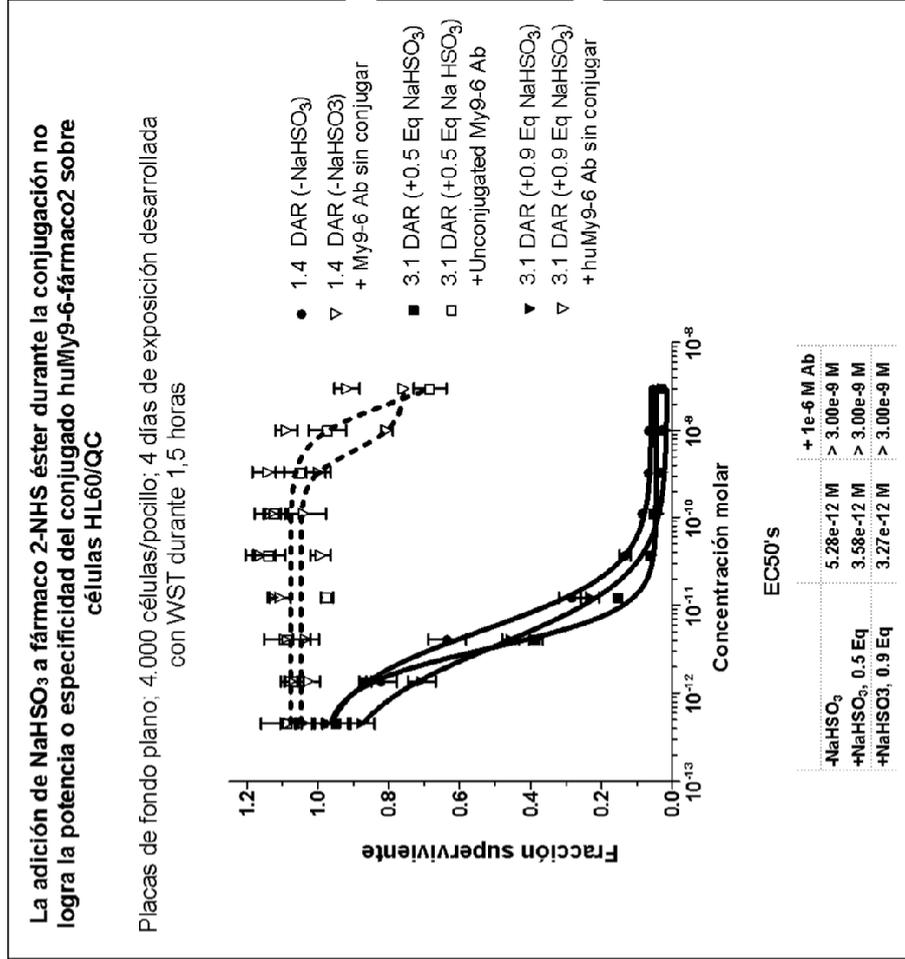


Figura 59 Conjugados anti-CD22 Ab-2 preparados sin y con bisulfito de sodio muestran citotoxicidad *in vitro* similar hacia células BJAB que expresan el antígeno CD22

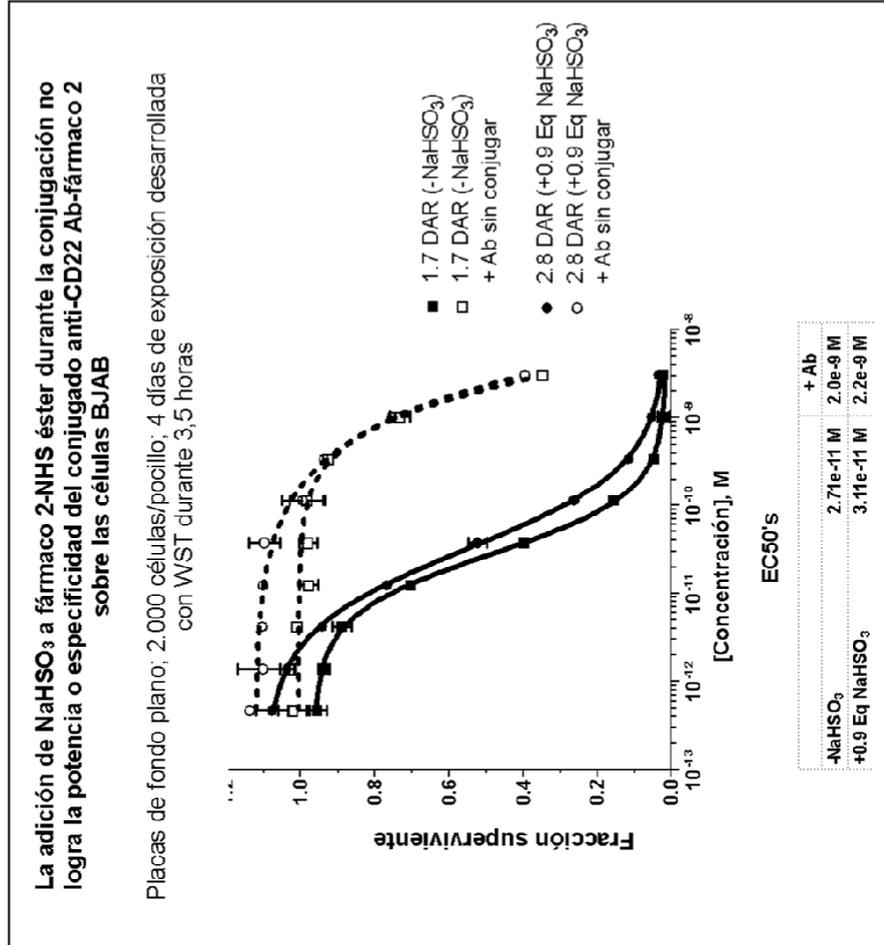


Figura 60.

