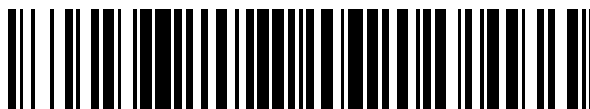


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 122**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

C07D 207/46 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2009 PCT/US2009/042267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09134977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2009 E 09739779 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2281006**

54 Título: **Reticulantes y sus usos**

30 Prioridad:

30.04.2008 US 49291 P
28.01.2009 US 147966 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.12.2017

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

CHARI, RAVI V. J.;
ZHAO, ROBERT YONGXIN;
KOVTUN, YELENA;
SINGH, RAJEEVA y
WIDDISON, WAYNE CHARLES

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 648 122 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

Reticulantes y sus usos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la síntesis de reticulantes cargados novedosos y a reticulantes que pueden procesarse por una célula diana dando restos cargados. La presente invención se refiere también a procedimientos de elaboración de conjugados de agente de unión celular-fármaco que comprenden la modificación de los agentes de unión celular con estos reticulantes, seguido de reacción con fármacos o modificación de los fármacos con estos reticulantes, seguido de reacción con agentes de unión celular. El procedimiento mejorado de elaboración de conjugados proporciona la capacidad de conectar un mayor número de moléculas de fármaco por agente de unión celular, dando como resultado una mayor potencia y proporcionando mayor solubilidad acuosa a los conjugados

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El reactivo de modificación bifuncional 3-(2-piridiltio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) se ha usado para conectar conjuntamente dos proteínas a través de un enlace disulfuro. El reactivo se hace reaccionar con la primera proteína para introducir un grupo que contiene disulfuro activo en la etapa de modificación. Se añade entonces una segunda proteína, que contiene un grupo tiol libre, para formar un enlace disulfuro entre las dos proteínas en la etapa de conjugación. Se han descrito muchos derivados de SPDP y versiones imida de SPDP (patente de EE.UU. 4.563.304; J. Carlsson y col. 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Goff D. A., Carroll, S. F. 1 BioConjugate Chem. 381-386 (1990); L. Delprino y col. 82 J. Pharm. Sci. 506-512 (1993); S. Arpicco y col., 8 BioConjugate Chem 327-337 (1997)).

Se han descrito conjugados de agentes de unión celular con fármacos altamente citotóxicos (patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064, 5.475.092, 5.585.499, 6.436.931, 6.372.738 y 6.340.701; R.V.J. Chari y col., 52 Cancer Res. 127-131 (1992)). En estos conjugados, se modifican en primer lugar los agentes de unión celular con un agente bifuncional tal como SPDP, SPP o SMCC para introducir un resto disulfuro o maleimido activos. La reacción con un fármaco citotóxico que contiene tiol proporciona un conjugado en que se conectan el agente de unión celular, tal como un anticuerpo monoclonal, y el fármaco a través de enlaces disulfuro o enlaces tioéter.

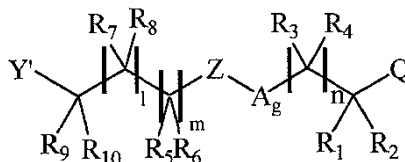
Se han descrito reticulantes heterobifuncionales que comprenden un grupo nitropiridiltio, dinitropiridiltio, *N,N*-dialquilcarboxamidopiridiltio o di-(*N,N*-dialquilcarboxamido)piridiltio y un grupo éster carboxílico reactivo tal como un grupo éster de *N*-succinimidilo o un grupo éster de *N*-sulfosuccinimidilo (patente de EE.UU. nº 6.913.748). Se reivindicó que la presencia de un grupo *N*-sulfosuccinimidilo proporcionaba mayor solubilidad acuosa a estos reticulantes. Sin embargo, una vez ha reaccionado el agente de unión celular con estos reticulantes, el grupo *N*-sulfosuccinimidilo se desplaza y se pierde la ventaja de solubilidad, tanto para el agente de unión celular modificado como para el conjugado de fármaco. Puesto que los fármacos citotóxicos usados en conjugados de agente de unión celular-fármaco son a menudo solo escasamente solubles en soluciones acuosas, a menudo es difícil conectar un número suficiente de moléculas de fármaco con el agente de unión celular y seguir manteniendo la solubilidad acuosa. Además, las reacciones tienen que realizarse en soluciones diluidas, que son engorrosas de aumentar de escala debido a la necesidad de usar grandes volúmenes de solución.

RESUMEN DE LA INVENCION:

La presente invención proporciona conectores cargados, donde las cargas se retienen tanto después de la modificación del agente de unión celular como en el conjugado de fármaco resultante. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de conectores cargados para conectar fármacos con un agente de unión celular (p.ej., un anticuerpo). En un aspecto de la invención, se usan los conectores cargados para modificar agentes de unión celular y conectarlos con fármacos. En otro aspecto de la invención, se usan los conectores cargados para modificar fármacos y conectarlos con agentes de unión celular. En aun otro aspecto de la invención, se usan conectores cargados para conectar simultáneamente fármacos y agentes de unión celular. En todos los aspectos, el resultado final preferido es un conjugado de conector cargado con fármaco-agente de unión celular que puede representarse por la fórmula $CB-(L^c-D)_q$, donde CB es un agente de unión celular, L^c es un conector cargado, D es una molécula de fármaco y q es un entero de 1 a 20. La presencia de un grupo o grupos cargados en el conector del conjugado de agente de unión celular-fármaco proporciona varias ventajas tales como i) mayor solubilidad acuosa del producto final, ii) capacidad de funcionar a una mayor concentración en soluciones acuosas, iii) capacidad de conectar un mayor número de moléculas de fármaco por molécula de agente de unión celular, dando como resultado una mayor potencia, iv) potencial de retener la especie de conjugado cargada dentro de la célula diana, dando como resultado una mayor potencia y v) sensibilidad mejorada de células multifarmacoresistentes, que serían incapaces de exportar la especie

de fármaco cargada de la célula. La invención describe también conectores que pueden acoplarse con un fármaco y un agente de unión celular dando un conjugado que puede metabolizarse en una célula, produciendo un metabolito de fármaco que contiene uno o mas restos cargados. Se hará referencia a estos conectores como conectores procargados. Se hará referencia a los restos de conector que se cargarán después del procesamiento celular como

En un aspecto de la presente divulgación, el reticulante cargado o procargado se representa por la fórmula (I), donde Y' puede reaccionar con un agente de unión celular y Q puede reaccionar con un fármaco citotóxico:



(I)

donde:

Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular;

Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, alquenoil o alquinoil lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, aniones tales como, pero sin limitación, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻ y cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ or X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ o un fenilo, donde:

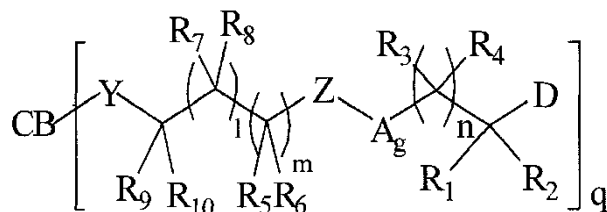
R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

1, m y n son 0 o un entero de 1 a 4; y

A es un fenilo o fenilo sustituido, donde el sustituyente es un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, o un sustituyente cargado seleccionado de entre aniones tales como, pero sin limitación, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻ y cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ or X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, donde X tiene la misma definición que anteriormente y donde g es 0 o 1;

Z es una unidad de polietileno opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, o una unidad F1-E1-P-E2-F2 en que E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O, O o NR₁₄, donde R₁₄ es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, un alquenoil o alquinoil lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono; P es una unidad peptídica de entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden conectarse con el péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietileno opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, a condición de que cuando Z no sea F1-E1-P-E2-F2, al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ sea un sustituyente cargado, o cuando g sea 1 al menos uno de A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ sea un sustituyente cargado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de agente de unión celular-fármaco de fórmula (II), en que el agente de unión celular, CB, y el fármaco, D, han reaccionado en los dos extremos del reticulante cargado o procargado:



(II)

donde:

CB representa un agente de unión celular;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, aniones tales como, pero sin limitación, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻, cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ o X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, o un fenilo, donde:

R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

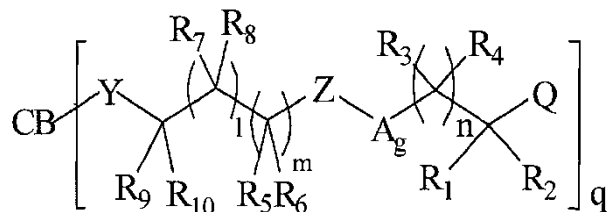
1, m y n son 0 o un entero de 1 a 4; y

A es un fenilo o fenilo sustituido, donde el sustituyente es un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono o un sustituyente cargado seleccionado de entre aniones tales como, pero sin limitación, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻, cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ o X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, donde X tiene la misma definición que anteriormente, y donde g es 0 o 1;

Z es una unidad de polietileno opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, o una unidad F1-E1-P-E2-F2 en que E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O, O o NR₁₄, donde R₁₄ es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, un alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono; P es una unidad peptídica de entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden conectarse con el péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietileno opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, a condición de que cuando Z no sea F1-E1-P-E2-F2, al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ sea un sustituyente cargado, o cuando g sea 1 al menos uno de A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ sea un sustituyente cargado;

Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y q representa un entero de 1 a 20.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un agente de unión celular modificado de fórmula (III) en que ha reaccionado el agente de unión celular, CB, con el reticulante que todavía tiene Q, un grupo capaz de reaccionar con un fármaco citotóxico:

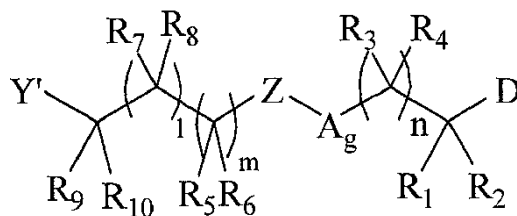


(III)

donde los sustituyentes son como se definen anteriormente.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un fármaco modificado de fórmula (IV) en que ha reaccionado el fármaco, D, con el reticulante que todavía tiene Y', un grupo capaz de reaccionar con el agente de unión celular:

5



(IV)

donde los sustituyentes son como se definen anteriormente.

10 La presente divulgación se refiere además a un procedimiento de elaboración de un conjugado de agente de unión celular-fármaco de fórmula (II), donde el fármaco está conectado con un agente de unión celular a través de un conector cargado o procargado.

La presente divulgación se refiere también a un procedimiento de elaboración de un agente de unión celular modificado de fórmula (III), donde se hace reaccionar el agente de unión celular con el conector cargado o procargado.

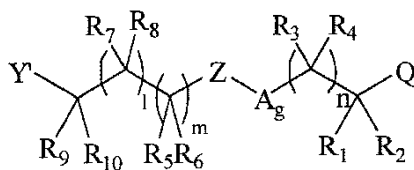
La presente divulgación se refiere también a un procedimiento de elaboración de un fármaco modificado de fórmula (IV), donde se hace reaccionar el fármaco con el conector cargado o procargado.

20 La presente divulgación incluye una composición (p.ej., una composición farmacéutica) que comprende conjugados o derivados del mismo (y/o solvatos, hidratos y/o sales del mismo) y un vehículo (un vehículo farmacéuticamente aceptable). La presente divulgación incluye también una composición (p.ej., una composición farmacéutica) que comprende conjugados o derivados del mismo (y/o solvatos, hidratos y/o sales del mismo) y un vehículo (un vehículo farmacéuticamente aceptable), que comprende además un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones
25 son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p.ej., ser humano).

La presente divulgación incluye un procedimiento de inhibición de un crecimiento celular anormal o de tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero (p.ej., un ser humano) que comprende administrar a dicho mamífero una
30 cantidad terapéuticamente efectiva de los conjugados o derivados del mismo, (y/o solvatos y sales del mismo) o una composición del mismo sola o en combinación con un segundo agente terapéutico.

Los compuestos de esta divulgación, derivados de los mismos o conjugados de los mismos y las composiciones que los comprenden son útiles para tratar o rebajar la gravedad de trastornos tales como los caracterizados por el
35 crecimiento anormal de células (p.ej., cáncer). Otras aplicaciones para compuestos o conjugados de esta divulgación incluyen, pero sin limitación, tratamiento de osteoporosis, depresión, ansiedad, estrés, fobias, pánico, disforia, trastornos psiquiátricos, y dolor o como antiepilépticos, antibacterianos, diuréticos e hipotensivos, hipolipidémicos y antidepresivos.

40 La presente invención proporciona un reticulante para elaborar un conjugado de agente de unión celular-fármaco, donde el reticulante se representa por la fórmula (I)

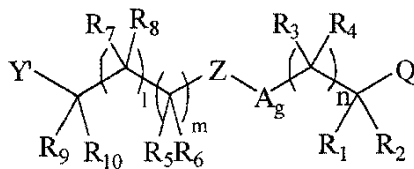


(I)

donde:

- 5 Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular seleccionado de entre un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana, donde Y' se selecciona de entre un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo, maleimida, halogenoacetato o cloruro de ácido carboxílico;
- 10 Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona de entre el grupo consistente en tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo;
- 15 uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1, donde: R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono; y Z está ausente.

- 20 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona el uso de un reticulante para elaborar un compuesto de la invención, donde el reticulante se representa por la fórmula (I)

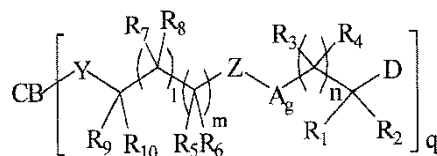


(I)

25 donde:

- Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular seleccionado de entre un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana, donde Y' es un grupo reactivo amina o un grupo reactivo tiol;
- 30 Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona de entre el grupo consistente en tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo;
- 35 uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1, donde: R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono; y Z está ausente.

- 40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de entre el grupo consistente en:



(II)

donde:

CB representa un agente de unión celular, donde el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se une a la célula diana;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1, donde:

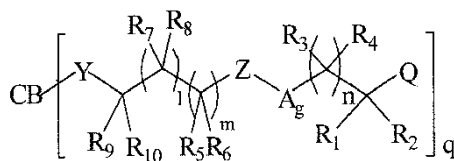
R₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal de 1 a 6 átomos de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

Z está ausente;

Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y

q representa un entero de 1 a 20.

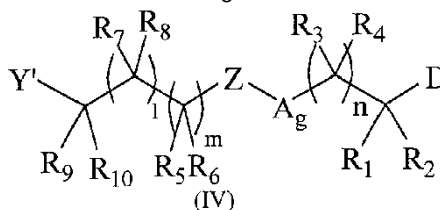
En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de entre el grupo consistente en:



(III)

;

o



(IV)

25 donde:

CB representa un agente de unión celular, donde el agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a la célula diana;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular, donde Y' se selecciona de entre un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo, maleimida, halogenoacetato o cloruro de ácido carboxílico;

Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona de entre el grupo consistente en tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo;

uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-

OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1, donde:
 R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal de 1 a 6 átomos de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;
 Z está ausente;
 Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y
 q representa un entero de 1 a 20.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico que contienen un grupo disulfuro de nitropiridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo. Se convierten en primer lugar los ésteres de hidroxialcanoato en ésteres de dibromoalcanoato como se muestra, seguido de conversión del sustituyente a-bromo en un ácido sulfónico.

La Figura 2 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico que contienen un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

Las Figuras 3, 4 y 5 muestran diversas rutas para la síntesis de agentes reticulantes cargados portadores de un éster de ácido carboxílico reactivo y un sustituyente maleimido, que posibilita la conexión a través de enlaces tioéter.

Las Figuras 6 y 7 muestran la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato que contienen un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

La Figura 8 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato que contienen un grupo disulfuro de nitropiridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

Las Figuras 9 y 10 muestran diferentes rutas para la síntesis de agentes reticulantes cargados que contienen fosfato portadores de un éster de ácido carboxílico reactivos y un sustituyente maleimido, que posibilita la conexión a través de enlaces tioéter.

La Figura 11 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico, donde el sustituyente sulfonato se enlaza con un grupo alquilo ramificado. Estos reactivos portan también un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

La Figura 12 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico, donde el sustituyente sulfonato se enlaza con un grupo alquilo ramificado. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo maleimido que permite la conexión a través de enlaces tioéter.

La Figura 13 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen amina cuaternaria que contienen un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

La Figura 14 muestra la síntesis de agentes reticulantes de amina cuaternaria portadores de un éster de ácido carboxílico reactivo y un sustituyente maleimido, que posibilita la conexión a través de enlaces tioéter.

La Figura 15 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico que contienen un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo. En estos compuestos, el sustituyente sulfonato está en el átomo de carbono en posición β al éster carboxilo.

La Figura 16 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato que contienen un grupo disulfuro de piridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo. En estos compuestos, el sustituyente fosfato está en la posición β respecto al éster carboxilo.

Las Figuras 17, 18 y 19 muestran la síntesis de diversos reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico que contienen una cadena de polietilenglicol (PEG), junto con un grupo disulfuro de nitropiridilo y un éster de ácido carboxílico reactivo.

Las Figuras 20 y 21 muestran la síntesis de diversos reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico que contienen una cadena de polietilenglicol (PEG) junto con un grupo maleimido y un éster de ácido carboxílico reactivo.

La Figura 22 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato, donde el sustituyente fosfato se enlaza con un grupo aromático. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo nitropiridilditio que permite la conexión a través de enlaces disulfuro.

La Figura 23 muestra la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato, donde el sustituyente fosfato se enlaza con un grupo alquilo ramificado. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo nitropiridilditio que permite la conexión a través de enlaces disulfuro.

Las Figuras 24-31 muestran la síntesis de reactivos reticulantes que contienen sulfonato que incorporan también un resto hidrazida que permite la conexión a través de enlaces lábiles a ácido.

Las Figuras 32-36 muestran la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato que incorporan también un resto hidrazina que permite la conexión a través de enlaces lábiles a ácido.

Las Figuras 37-38 muestran la síntesis de reactivos reticulantes que contienen amina cuaternaria que incorporan también un resto hidrazida que permite la conexión a través de enlaces lábiles a ácido.

Las Figuras 39-42 muestran la síntesis de reactivos reticulantes cargados que incorporan también un resto de polietilenglicol (PEG).

5 Las Figuras 43-44 muestran la síntesis de reactivos reticulantes que contienen fosfato, donde el sustituyente fosfato se enlaza con un residuo aromático o un grupo alquilo. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo nitropiridilditio que permite la conexión a través de enlaces disulfuro.

Las Figuras 45-49 muestran la síntesis de agentes reticulantes cargados portadores de éster de ácido carboxílico reactivo y un sustituyente halogenoacetilo que posibilita la conexión a través de enlaces tioéter.

10 La Figura 50 muestra la síntesis de un conector procargado que generaría un metabolito carboxilato cargado negativamente.

La Figura 51 muestra un conjugado del conector 158 con un fármaco y un anticuerpo monoclonal y cómo se procesaría el conjugado en el lisosoma de una célula diana, dando un metabolito que contiene el fármaco portador de un carboxilato cargado negativamente.

15 La Figura 52 muestra la síntesis de un conector procargado que generaría un metabolito que contiene amina cargado positivamente.

La Figura 53 muestra un conjugado de un conector procargado con un fármaco y un anticuerpo monoclonal y cómo se procesaría el conjugado en el lisosoma de una célula diana, dando un metabolito del fármaco portador de una amina cargada positivamente.

20 La Figura 54 muestra la síntesis de un conector procargado que generaría un metabolito de carboxilato cargado.

La Figura 55 muestra un conjugado del conector 172 con un fármaco y un anticuerpo monoclonal y cómo se procesaría el conjugado en un lisosoma de una célula diana, dando un metabolito que contiene el fármaco portador de un ácido carboxílico y un residuo de lisina.

25 La Figura 56 muestra el uso de un conector cargado en la modificación de un agente de unión celular y la producción de un conjugado de agente de unión celular-fármaco portador de un conector cargado.

Las Figuras 57(A), (B) y (C) muestran la potencia *in vitro* de conjugados de agente de unión celular-fármaco en que se incorpora un reticulante cargado.

30 La Figura 58 muestra la potencia *in vitro* y la selectividad de diana de conjugados de agente de unión celular-fármaco portadores de un reticulante cargado.

La Figura 59 muestra el espectro de masas de conjugados de agente de unión celular-fármaco portadores de un reticulante cargado.

La Figura 60 muestra la citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-conector sulfonato-maitansinoide con carga creciente de maitansinoides (E:A) frente a células COLO205.

35 La Figura 61 muestra la citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-conector sulfonato-maitansinoide con carga creciente de maitansinoides (E:A) frente a células COLO205-MDR multifarmacorresistentes.

La Figura 62 compara la citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-conector sulfonato-maitansinoide con o sin grupo sulfonato en el conector frente a células COLO205-MDR multifarmacorresistentes.

40 La Figura 63 compara la citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoides con o sin grupo sulfonato en el conector frente a células COLO205-MDR multifarmacorresistentes.

La Figura 64 compara la citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoides con o sin grupo sulfonato en el conector frente a células HCT15 multifarmacorresistentes.

45 La Figura 65 compara la citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoides con o sin grupo sulfonato en el conector frente a células COLO205-MDR multifarmacorresistentes.

La Figura 66 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de conjugados de anticuerpo anti-EpCAM-maitansinoide sobre xenoinjertos de COLO205 *mdr* (tumores individuales).

50 La Figura 67 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de conjugados de anticuerpo anti-EpCAM-maitansinoide sobre xenoinjertos de COLO205 (tumores individuales).

Las Figuras 68-70 muestran los procedimientos de síntesis de reactivos reticulantes que contienen ácido sulfónico. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo maleimido que permite la conexión a través de enlaces tioéter.

55 La Figura 71 muestra los procedimientos de síntesis de reactivos reticulantes que contienen amina cuaternaria. Estos reactivos portan también un éster de ácido carboxílico reactivo y un grupo piridilditio que permite la conexión a través de enlaces disulfuro.

Las Figuras 72(A) y (B) muestran la farmacocinética plasmática de conjugados de anticuerpo huC242-sulfo-Mal-DM4 [marcado con ^3H] con 3,5 DM4/Ac o 6,4 DM4/Ac dosificados a 12,9 mg/kg y 7,9 mg/kg (i.v.) respectivamente en ratones CD-1. A. Concentraciones de Ac (medidas por ELISA o recuentos de 3H) frente al tiempo después de la administración. B. Relación de maitansinoide (DM4)/anticuerpo (Ac) frente al tiempo

después de la administración.

En las Figuras 1-71, cuando sea aplicable, n representa 0 o un entero de 1 a 10, y m representa 0 o un entero de 1 a 2.000.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

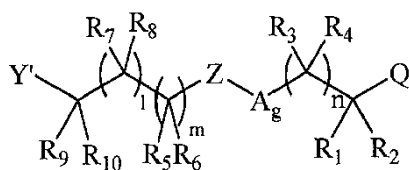
Los conjugados novedosos divulgados en la presente memoria usan reticulantes cargados o procargados. Se muestran en las Figuras 1 a 10 ejemplos de algunos reticulantes adecuados y su síntesis. Preferiblemente, los reticulantes cargados o procargados son aquellos que contienen sustituyentes sulfonato, fosfato, carboxilo o amina cuaternaria que aumentan significativamente la solubilidad del agente de unión celular modificado y los conjugados de agente de unión celular-fármaco, especialmente para conjugados de anticuerpo monoclonal-fármaco con 2 a 20 fármacos/anticuerpo conectados. Los conjugados preparados a partir de conectores que contienen un resto procargado producirían uno o más restos cargados después de metabolizar el conjugado en una célula.

15

Reticulantes

Se muestran las rutas sintéticas para producir reticulantes cargados de la presente divulgación en las Figuras 1-49. Se muestran las rutas sintéticas para producir reticulantes con restos procargados en las Figuras 50, 52 y 54. Las Figuras 51, 53 y 55 muestran un conjugado de cada uno de los conectores procargados respectivos con un fármaco y un anticuerpo monoclonal y cómo se metabolizarían estos conjugados en una célula diana, dando metabolitos cargados. Los reticulantes poseen tres elementos: a) un sustituyente que está cargado o se cargará cuando los conjugados que emplean estos reticulantes se metabolicen en células. La carga será aniónica tal como, pero sin limitación, carboxilato, sulfonato o fosfato, o catiónica tal como, pero sin limitación, una amina terciaria, cuaternaria o primaria o un heterociclo que contiene nitrógeno, b) un grupo tal como un éster de *N*-hidroxisuccinimida, grupo maleimido, grupo halogenoacetilo e hidrazida, capaz de de reacción con un agente de unión celular y c) un grupo tal como, pero sin limitación, un disulfuro, maleimida, halogenoacetilo e hidrazida, capaz de reacción con un fármaco. El sustituyente cargado o procargado puede introducirse mediante procedimientos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede introducirse una carga sulfonato tratando en primer lugar un compuesto de halogenoéster disponible comercialmente con tioacetato, produciendo un compuesto de tioacetilo, seguido de oxidación del grupo tioacetilo usando peróxido de hidrógeno hasta un grupo sulfonato. Los reticulantes que contienen fosfato pueden sintetizarse mediante procedimientos descritos en la presente memoria. En primer lugar, se introduce el grupo reactivo deseado tal como, pero sin limitación, tiol, maleimida, halogenoacetilo e hidrazida, mediante las reacciones mostradas en las Figuras 6-10, seguido de hidrólisis del éster fosfato, dando el reticulante cargado portador de un fosfato. Puede introducirse una amina cuaternaria cargada positivamente en el reticulante mediante reacción de una amina con una cetona α,β -insaturada (véanse, por ejemplo, las Figuras 13 y 37). Como alternativa, puede introducirse un sustituyente de amina cargada mediante desplazamiento de un halógeno con la amina o heterociclo que contiene nitrógeno de elección.

Preferiblemente, los reticulantes son compuestos de la fórmula (I) siguiente:



(I)

donde Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular; Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, aniones tales como, pero sin limitación, SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, PO₃²⁻, X-PO₃²⁻, CO₂⁻ y cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃o X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ o un fenilo, donde:

50

R_{11} , R_{12} y R_{13} son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

l, m y n son 0 o un entero de 1 a 4;

5 A es un fenilo o fenilo sustituido, donde el sustituyente es un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono o un sustituyente cargado seleccionado de entre aniones tales como, pero sin limitación, SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- y cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}O$ $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$, donde X tiene la misma definición que anteriormente, y donde g es 0 o 1;

10 Z es una unidad de polietileno opcional de fórmula $(OCH_2CH_2)_p$, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, o una unidad F1-E1-P-E2-F2 en que E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O, O o NR₁₄, donde R₁₄ es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, un alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono; P es una unidad peptídica de entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2
15 pueden conectarse con el péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietileno opcional de fórmula $(OCH_2CH_2)_p$, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, a condición de que cuando Z no sea F1-E1-P-E2-F2, al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ sea un sustituyente cargado, o cuando g sea 1 al menos uno de A, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀
20 sea un sustituyente cargado.

Los ejemplos de grupo funcional Y' que posibilita la reacción con un agente de unión celular incluyen agentes reactivos con amina tales como, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo; agentes reactivos con tiol tales como, pero sin limitación, disulfuros de
25 piridilo, disulfuros de nitropiridilo, maleimidas, halogenoacetatos y cloruros de ácido carboxílico.

Los ejemplos de grupo funcional Q que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico incluyen grupos que posibilitan la conexión a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, carbamato o amida. Tales grupos funcionales incluyen, pero sin limitación, tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehídos, maleimido, halogenoacetilo, hidrazinas e hidroxi.
30

Los ejemplos de alquilo lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Los ejemplos de alquilo ramificados o cíclicos que tienen de 3 a 6 átomos de carbono incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.
35

Los ejemplos de alqueno lineales que tienen de 2 a 6 átomos de carbono incluyen etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo. Los ejemplos de alqueno ramificados o cíclicos que tienen de 2 a 6 átomos de carbono incluyen isobutenilo, isopentenilo, 2-metil-1-pentenilo y 2-metil-2-pentenilo.

40 Los ejemplos de alquino lineales que tienen de 2 a 6 átomos de carbono incluyen etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo. Los ejemplos de alquino ramificados o cíclicos que tienen hasta 6 átomos de carbono incluyen 3-metil-1-butinilo, 3-metil-1-pentinilo y 4-metil-2-hexinilo.

En aspectos preferidos, uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉, R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre sulfonato, fosfato o trialkilamonio, y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0, n= 1, Q e Y' son cada uno independientemente un
45 sustituyente disulfuro, un maleimido, un grupo halogenoacetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida. En otro aspecto más preferido, uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sulfonato y el resto son H; 1 g y m son cada uno 0, n= 1; Q es un resto disulfuro, maleimido o halogenoacetilo e Y' es un resto maleimido o un éster de N-hidroxisuccinimida. En un aspecto aun más preferido, uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sulfonato y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0,
50 n= 1, Q es un grupo piridilditio o nitropiridilditio, un resto maleimido o halogenoacetilo e Y' es un éster de N-hidroxisuccinimida.

Se muestra la síntesis de reticulantes que contienen 2-ditionitropiridilo y 2-ditiodinitropiridilo de fórmulas (I), por ejemplo, en las Figuras 1 y 2, y se muestra la síntesis de los correspondientes reticulantes que contienen 4-
55 ditionitropiridilo y 4-ditiodinitropiridilo de fórmula (I), por ejemplo, en la Figura 6. Se muestra la síntesis de reticulantes cargados que contienen maleimido de fórmula (I) con un grupo sulfonato, por ejemplo, en las Figuras 3, 4 y 5. Se muestra la síntesis de reticulantes cargados que contienen maleimido de fórmula (I) con un grupo fosfato, por ejemplo, en las Figuras 9 y 10. Se muestra la síntesis de reticulantes cargados que contienen amina cuaternaria de fórmula (I), por ejemplo, en las Figuras 13 y 14. Se muestra la síntesis de reticulantes cargados que contienen polietilenglicol de
60 fórmula (I), por ejemplo, en las Figuras 17-21. Se muestra la síntesis de reticulantes cargados de fórmula (I) portadores

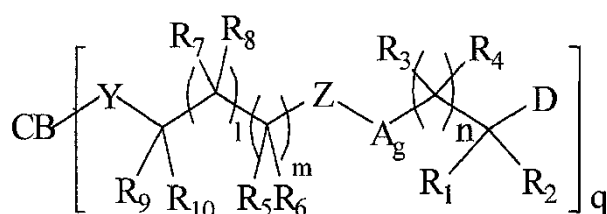
de un resto hidrazida que posibilita la conexión a través de enlaces lábiles a ácido, por ejemplo, en las Figuras 24-36.

Conjugados de agente de unión celular-fármaco

- 5 Usando los reticulantes cargados o procargados, puede introducirse un alto número (>6) de moléculas de fármaco. En ejemplos no limitantes, la Figura 57 ejemplifica que los conjugados de agente de unión celular-fármaco preparados usando un reticulante cargado de la presente invención exhiben alta potencia. Además, la potencia es selectiva de diana (véase, por ejemplo, la Figura 58) puesto que, incluso después de la conexión de un alto número de moléculas de fármaco, el conjugado es muy potente frente a células diana, pero mucho menos potente frente a células no diana.
- 10 Como se ejemplifica en la Figura 59, el análisis espectral de masas demuestra que los fármacos están conectados covalentemente al agente de unión celular a través del reticulante cargado.

Los conjugados de la presente divulgación pueden representarse por la siguiente fórmula $CB-(L^c-D)_q$, donde CB es un agente de unión celular, L^c es un conector cargado o procargado, D es una molécula de fármaco y q es un entero de 1 a 20.

Preferiblemente, los conjugados tienen la siguiente fórmula (II):



(II)

donde CB representa un agente de unión celular;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, alquenoil o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, aniones tales como, pero sin limitación, SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}CO_2^-$, cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}O$ $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$ o un fenilo, donde:

R_{11} , R_{12} y R_{13} son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

l, m y n son 0 o un entero de 1 a 4;

A es un fenilo o fenilo sustituido, donde el sustituyente es un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono o un sustituyente cargado seleccionado de entre aniones tales como, pero sin limitación, SO_3^- , $X-SO_3^-$, OPO_3^{2-} , $X-OPO_3^{2-}$, PO_3^{2-} , $X-PO_3^{2-}$, CO_2^- , cationes tales como, pero sin limitación, un heterociclo que contiene nitrógeno, $N^+R_{11}R_{12}R_{13}O$ $X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$, donde X tiene la misma definición que anteriormente; y donde g es 0 o 1;

Z es una unidad de polietileno opcional de fórmula $(OCH_2CH_2)_p$, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, o una unidad F1-E1-P-E2-F2 en que E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O, O o NR14, donde R_{14} es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, un alquenoil o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 6 átomos de carbono; P es una unidad peptídica de entre 2 y 20 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden conectarse con el péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietileno opcional de fórmula $(OCH_2CH_2)_p$, donde p es 0 o un entero de 2 a aproximadamente 1000, a condición de que cuando Z no sea F1-E1-P-E2-F2, al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} sea un sustituyente cargado, o cuando g sea 1 al menos uno de A, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} sea un sustituyente cargado;

Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y q representa un entero de 1 a 20.

Como se describe con más detalle a continuación, el fármaco puede ser cualquiera de muchos fármacos de molécula pequeña incluyendo, pero sin limitación, maitansinoides, análogos de CC-1065, morfolinos, doxorubicinas, taxanos, criptoficinas, epotilones, calicheamicinas, auristatinas y dímeros de pirrolobenzodiacepina.

5

En aspectos preferidos, uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es un sustituyente cargado seleccionado de entre sulfonato, fosfato, carboxilato o trialkilamonio, y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0, $n = 1$, D es un maitansinoide, un análogo de CC-1065 o un dímero de pirrolidobenzodiacepina. En otro aspecto más preferido, uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es un sulfonato y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0, $n = 1$, D es un maitansinoide, un análogo de CC-1065 o un

10 dímero de pirrolidobenzodiacepina conectado a través de un enlace disulfuro, tioéster o tioéter. En un aspecto más preferido adicional, uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es un sulfonato y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0, $n = 1$ y Q es un maitansinoide, un análogo de CC-1065 o un taxano.

En un aspecto preferido, cuando Z es una unidad F1-E1-P-E2-F2, E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O o NR₁₄, donde R₁₄ es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, P es una unidad peptídica de entre 2 y 8 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden estar conectados al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido, siendo residuos aminoacídicos preferidos glicina (gly), alanina (ala), leucina (leu), ácido glutámico (glu) o lisina (lys), que pueden usarse en cualquier combinación o cualquier orden (p.ej., gly-gly-gly o ala-leu-ala-leu, etc.) y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietilenoxi opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 p un entero de 2 a aproximadamente 1000.

20

En un aspecto más preferido, cuando Z es una unidad F1-E1-P-E2-F2, E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O o NR₁₄, donde R₁₄ es H o un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, P es una unidad peptídica de entre 2 y 5 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden estar conectados al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietilenoxi opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a 24.

25

Preferiblemente q, el número de fármacos unidos a cada agente de unión celular, es 1-20, más preferiblemente 2-18, y todavía más preferiblemente 2-16 y lo más preferiblemente 2-10.

30

Para sintetizar el conjugado, puede modificarse el agente de unión celular con los reticulantes de la presente divulgación para introducir grupos disulfuro reactivos, grupos maleimido, halogenoacetilo o hidrazida. La síntesis de conjugados de agente de unión celular-fármaco conectados a través de enlaces disulfuro se consigue mediante un intercambio de disulfuro entre el enlace disulfuro en el agente de unión celular modificado y un fármaco que contiene un grupo tiol libre. La síntesis de conjugados de agente de unión celular-fármaco conectados a través de tioéter se consigue mediante reacción del agente de unión celular modificado con maleimido o halogenoacetilo y un fármaco que contiene un grupo tiol libre. La síntesis de conjugados portadores de una conexión de hidrazina lábil a ácidos puede conseguirse mediante reacción de un grupo carbonilo con el resto hidrazida en el conector, mediante procedimientos conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, P. Hamann y col., BioConjugate Chem., 13; 40-46, 2002; B. Laguzza y col., J. Med. Chem., 32; 548-555, 1959; P. Trail y col., Cancer Res., 57; 100-105, 1997).

35

40

Como alternativa, el fármaco puede modificarse con los reticulantes de la presente divulgación, dando un fármaco modificado de fórmula (IV) portador de una funcionalidad capaz de reaccionar con un agente de unión celular. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un fármaco que contiene tiol con el reticulante cargado o procargado de fórmula (I) portador de un sustituyente maleimido a pH neutro en tampón acuoso, dando un fármaco conectado con el conector cargado a través de una conexión de tioéter. Un fármaco que contiene tiol puede experimentar intercambio de disulfuro con un conector cargado portador de un resto piridildio, dando un fármaco modificado enlazado a través de un enlace disulfuro con el reticulante cargado. Puede hacerse reaccionar un fármaco portador de un grupo hidroxilo con un reticulante cargado o procargado portador de un halógeno, en presencia de una base débil, dando un fármaco modificado portador de una conexión de éter. Un fármaco que contiene un grupo hidroxilo puede condensarse con un reticulante cargado de fórmula (I) portador de un grupo carboxilo, en presencia de un agente deshidratante tal como diciclohexilcarbodiimida, dando una conexión de éster. Un fármaco que contiene un grupo amino puede experimentar similarmente condensación con un grupo carboxilo en el reticulante cargado o procargado de fórmula (I), dando un

50

55

El conjugado puede purificarse mediante medios bioquímicos estándares, tales como filtración en gel en una columna Sephadex G25 o Sephacryl S300, cromatografía de adsorción e intercambio iónico o por diálisis como se describe anteriormente. En algunos casos (p.ej., ácido fólico, hormona estimulante de melanocito, EGF, etc.), los conjugados de agente de unión celular-fármaco pueden purificarse por cromatografía tal como por HPLC, cromatografía en

60

soluciones acuosas de los agentes de unión celular están tamponadas a entre pH 6 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,5, y pueden contener cualquier sal tampón no nucleófila útil para estos intervalos de pH. Los tampones típicos incluyen tampones fosfato, trietanolamina-HCl, HEPES y MOPS, que pueden contener componentes adicionales tales como sacarosa y sales, por ejemplo NaCl. Después de la adición, se incubaba la reacción a una temperatura de 4 a 40

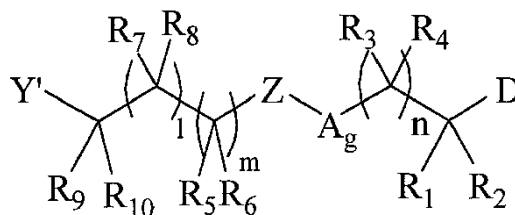
- 5 °C, preferiblemente a temperatura ambiente. La progresión de la reacción puede monitorizarse midiendo el aumento de la absorción a 495 nm u otra longitud de onda apropiada. Después de completar la reacción, puede efectuarse el aislamiento del agente de unión celular modificado de modo rutinario, usando por ejemplo cromatografía de filtración en gel o cromatografía adsorbtiva.
- 10 La extensión de la modificación puede valorarse midiendo la absorbancia del grupo nitropiridintona, dinitropiridinditiona, carboxamidopiridinditiona o dicarboxamidopiridinditiona liberado. En un ejemplo no limitante, la Figura 56 muestra los resultados de la modificación del agente de unión celular, el anticuerpo C242, con un reticulante de sulfonato de la presente invención. Se muestra el curso temporal de la incorporación de conector/anticuerpo (C/A), por ejemplo, junto con la de fármacos/anticuerpo (F/A) conectada. Los reticulantes cargados o procargados descritos
- 15 en la presente memoria tienen diversos grupos funcionales que pueden reaccionar con cualquier agente de unión celular que posea un sustituyente adecuado. Por ejemplo, los agentes de unión celular portadores de un sustituyente amino o hidroxilo pueden reaccionar con reticulantes portadores de un éster de N-hidroxisuccinimida y los agentes de unión celular portadores de un sustituyente tiol pueden reaccionar con reticulantes portadores de un grupo maleimido o halogenoacetilo. Adicionalmente, los agentes de unión celular portadores de un sustituyente carbonilo pueden reaccionar con reticulantes portadores de una hidrazida. Un especialista en la materia puede determinar fácilmente
- 20 cuál reticulante usar basándose en la reactividad conocida del grupo funcional disponible sobre el agente de unión celular.

- Los reticulantes portadores de una carga positiva (por ejemplo, compuesto 214, Figura 71) pueden hacerse reaccionar
- 25 directamente con un agente de unión celular en tampón acuoso a un pH de entre 5 y 9, que contiene opcionalmente un codisolvente orgánico (tal como dimetilacetamida o etanol al 1 a 20 %), proporcionando un agente de unión celular modificado portador de una carga positiva y un grupo tiol. El grupo tiol del agente de unión celular puede hacerse reaccionar con un fármaco citotóxico portador de un maleimido, halogenoacetamido o disulfuro activo (por ejemplo, un grupo piridilditio o nitropiridilditio), proporcionando un conjugado. El conjugado puede purificarse mediante los
- 30 procedimientos descritos anteriormente.

- Como alternativa, los reticulantes portadores de una carga positiva y un éster reactivo (por ejemplo, el compuesto 216, Figura 71) pueden hacerse reaccionar directamente con un agente de unión celular (por ejemplo, a través de su grupo amino de lisina), introduciendo una carga positiva y un disulfuro activo. La reacción con un fármaco citotóxico que
- 35 contiene tiol como se describe anteriormente puede proporcionar un conjugado portador de una carga positiva.

Fármacos citotóxicos modificados

- Los fármacos citotóxicos modificados por la reacción con reticulantes de la presente divulgación se representan
- 40 preferiblemente por la fórmula (IV):



(IV)

- donde los sustituyentes son como se describen anteriormente para el conector cargado o procargado y el conjugado
- 45 de agente de unión celular-fármaco.

- En aspectos preferidos, uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre sulfonato, fosfato, carboxilo o trialquilamonio, y el resto son H; 1l, g y m son cada uno 0, n= 1 e Y' es un sustituyente disulfuro, un grupo maleimido o halogenoacetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida. En otro aspecto más preferido, uno de R₁,
- 50 R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sulfonato y el resto son H; 1, g y m son cada uno 0, n= 1 e Y' es un resto maleimido o un

éster de *N*-hidroxisuccinimida. En un aspecto más preferido adicional, uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sulfonato y el resto son H; l, g y m son cada uno 0, n= 1 e Y' es un éster de *N*-hidroxisuccinimida.

En un aspecto preferido, cuando Z es una unidad F1-E1-P-E2-F2, E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O o NR₁₄, donde R₁₄ es H, un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, P es una unidad peptídica de entre 2 y 8 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden estar conectados al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido, siendo residuos aminoácídicos preferidos glicina (gly), alanina (ala), leucina (leu), ácido glutámico (glu) o lisina (lys), que pueden usarse en cualquier combinación o cualquier orden (p.ej., gly-gly-gly o ala-leu-ala-leu, etc.) y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietilenoxi opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 p un entero de 2 a aproximadamente 1000.

En un aspecto más preferido, cuando Z es una unidad F1-E1-P-E2-F2, E1 y E2 son iguales o diferentes y son C=O o NR₁₄, donde R₁₄ es H o un alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, P es una unidad peptídica de entre 2 y 5 aminoácidos de longitud, donde E1 o E2 pueden estar conectados al péptido a través del nitrógeno terminal, carbono terminal o a través de una cadena lateral de uno de los aminoácidos del péptido; y F1 y F2 son iguales o diferentes y son una unidad de polietilenoxi opcional de fórmula (OCH₂CH₂)_p, donde p es 0 o un entero de 2 a 24.

Los fármacos modificados pueden prepararse haciendo reaccionar el fármaco con los reticulantes de la presente divulgación, dando un fármaco modificado de fórmula (IV) portador de una funcionalidad capaz de reaccionar con un agente de unión celular. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar un fármaco que contiene tiol con el reticulante cargado o procargado de fórmula (I) portador de un sustituyente maleimido a pH neutro en tampón acuoso, dando un fármaco conectado con el conector cargado a través de una conexión de tioéter. Un fármaco que contiene tiol puede experimentar intercambio de disulfuro con un conector cargado o procargado portador de un resto piridilditio, dando un fármaco modificado enlazado a través de un enlace disulfuro con el reticulante cargado o procargado. Un fármaco portador de un grupo hidroxilo con un reticulante cargado portador de un halógeno puede hacerse reaccionar, en presencia de una base débil, dando un fármaco modificado portador de una conexión de éter. Un fármaco que contiene un grupo hidroxilo puede condensarse con un reticulante cargado de fórmula (I) portador de un grupo carboxilo, en presencia de un agente deshidratante tal como dicitclohexilcarbodiimida, dando una conexión de éster. Un fármaco que contiene un grupo amino puede experimentar similarmente condensación con un grupo carboxilo en el reticulante cargado o procargado de fórmula (I), dando un enlace amida. El fármaco modificado puede purificarse mediante procedimientos estándares, tales como cromatografía en columna sobre gel de sílice o alúmina, cristalización, cromatografía en capa fina preparatoria, cromatografía de intercambio iónico o HPLC.

35 Agentes de unión celular

El agente de unión celular que comprende los conjugados y agentes de unión celular modificados de la presente divulgación puede ser de cualquier clase conocida actualmente, o que se vuelva conocida, e incluye péptidos y no péptidos. El agente de unión celular puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, de manera específica o no específica. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo), adnectinas (nº de publicación de EE.UU.: 20070082365), interferones, linfocinas, 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 (por ejemplo, de murino, humano, humanizado, remodelado o quimérico o cualquier otro anticuerpo conocido por un especialista en la materia), se une a un antígeno que es un polipéptido y puede ser una molécula transmembrana (p.ej., receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor vmc, factor IX, factor tisular (FT) y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno tal como urocinasa o activador de plasminógeno de orina humana o de tipo tejido (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulación por activación expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una seroalbúmina tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA) tal como 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 factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a 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 insulina, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, receptores EphA, receptores EphB, receptor de folato, mesotelina, cripto, integrinas α _v β ₆, VEGF, VEGFR, receptor de transferrina, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, 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 a tumor o receptores de superficie celular divulgados en la publicación de EE.UU. nº 20080171040o la publicación de EE.UU. nº 20080305044; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), p.ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), p.ej., IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígenos víricos tales como, por ejemplo, una porción de la cubierta de VIH; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD 11 a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4, EpCAM y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4 y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente enumerados.
- Los antígenos preferidos para los anticuerpos englobados por la presente invención incluyen también proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD46; miembros de la familia del receptor ErbB tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, EpCAM, integrina α ₄ β ₇ e integrina α _v β ₃, incluyendo las subunidades α o β de la misma (p.ej., anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; factor tisular (FT); TGF- β ; interferón α (IFN- α); una interleucina tal como IL-8; IgE; antígenos de grupo sanguíneo Apo2, receptor de muerte; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, etc. Los anticuerpos preferidos que pueden usarse son anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, receptores EphA (p.ej., receptor EphA2), receptores EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, trastuzumab, pertuzumab, mesotelina, cripto, integrinas α _v β ₆, VEGF, VEGFR, receptor de folato (por ejemplo, FOLR1), receptor de transferrina, GD3, EpCAM o un anticuerpo que se una a uno o mas antígenos asociados a tumor o receptores de superficie celular divulgados en la publicación de EE.UU. nº 20080171040o la publicación de EE.UU. nº 20080305044.
- Los ejemplos adicionales de agentes de unión celular que pueden usarse incluyen:
- anticuerpos remodelados (patente de EE.UU. nº 5.639.641);
 - anticuerpos humanizados o totalmente humanos, seleccionados, pero sin limitación, de entre huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, trastuzumab, pertuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab y rituximab (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. nº 5.639.641, 5.665.357 y 7.342.110, la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 60/424.332, la solicitud de patente internacional WO 02/16.401, la publicación de patente de EE.UU. número 20060045877, la publicación de patente de EE.UU. número 20060127407, la publicación de patente de EE.UU. número 20050118183, Pedersen y col., (1994) J. Mol. Biol. 235, 959-973, Roguska y col., (1994) Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 91, 969-973, *supra*, Colomer y col., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001), Heider y col., Eur. J. Cancer, 31A: 2385-2391 (1995), Welt y col., J. Clin. Oncol, 12: 1193-1203 (1994) y Maloney y col., Blood, 90: 2188-2195 (1997)) y
 - fragmentos de unión a epítipo de anticuerpos tales como sFv, Fab, Fab', y F(ab')₂ (Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983); Spring y col., J. Immunol. 113: 470-478 (1974); Nisonoff y col., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244, 1960).
- Los agentes de unión celular adicionales incluyen otras proteínas de unión celular y polipéptidos ejemplificados, pero sin limitación, por:
- proteínas de repetición de anquirina (DARPinas; Zahnd y col., J. Biol. Chem., 281, 46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268) o proteínas de repetición de anquirina o péptidos sintéticos descritos, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. número 20070238667; la patente de EE.UU. nº 7.101.675 y los documentos WO/2007/147213; WO/2007/062466);
 - interferones (p.ej., α , β , γ);
 - linfocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
 - hormonas tales como insulina, TRH (hormonas de liberación de tirotropina), MSH (hormona estimulante de melanocitos), hormonas esteroideas tales como andrógenos y estrógenos;

- vitaminas tales como ácido fólico;
- factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias tales como EGF, TGF- α , G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5: 155-158 (1984)); y
- transferrina (O'Keefe y col., J. Biol. Chem. 260: 932-937, 1985).

5

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular específicos en forma de anticuerpos monoclonales. Son particularmente bien conocidas en la materia técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos inmunizando ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus enteros, virus enteros atenuados y proteínas víricas tales como proteínas de cubierta vírica. Pueden usarse también células humanas sensibilizadas. Otro procedimiento de creación de anticuerpos monoclonales es el uso de colecciones en fago de sFv (región variable monocatenaria), específicamente sFv humana (véanse, p.ej., Griffiths y col., patente de EE.UU. nº 5.885.793; McCafferty y col., WO 92/01047 y Liming y col., WO 99/06587.)

10

- 15 La selección del agente de unión celular apropiado es una cuestión de elección que depende de la población celular particular que vaya a ser la diana, pero en general se prefieren anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a epítipo de los mismos, si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal My9 es un anticuerpo IgG_{2a} de murino que es específico del antígeno CD33 encontrado en células de leucemia mieloide aguda (LMA) (Roy y col. Blood 77: 2404-2412 (1991)) y puede usarse para tratar pacientes de LMA. De forma similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG₁ de murino que se une al antígeno CD19 en linfocitos B (Nadler y col., J. Immunol. 131: 244-250 (1983)) y puede usarse si las células diana son linfocitos B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en linfoma no de Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica. De forma similar, el anticuerpo N901 es un anticuerpo monoclonal IgG₁ de murino que se une a CD56 encontrado en células de carcinoma microcítico pulmonar y en células de otros tumores de origen neuroendocrino (Roy y col. J. Nat. Cancer Inst. 88: 1136-1145 (1996)), el anticuerpo C242 que se une al antígeno CanAg, pertuzumab, trastuzumab que se une a HER2/neu y anticuerpo anti-receptor de EGF.

25

Adicionalmente, el GM-CSF, que se une a células mieloides, puede usarse como agente de unión celular a células enfermas de leucemia mielogenosa aguda. La IL-2, que se une a linfocitos T activados, puede usarse para la prevención de rechazo de injerto de trasplante, para la terapia y prevención de la enfermedad del injerto contra el hospedador y para el tratamiento de leucemia de linfocitos T aguda. La MSH, que se une a melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico, que tiene como diana el receptor de folato expresado en cáncer de ovario y otros, es también un agente de unión celular adecuado.

30

35 Los cánceres de mama y testículos pueden ser dianas exitosas con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno), respectivamente, como agentes de unión celular.

Fármacos

40

Los fármacos que pueden usarse en la presente invención incluyen agentes quimioterapéuticos. "Agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; 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 CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (p.ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma I y calicheamicina teta I, véase, p.ej., Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina (así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enediina cromoproteicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina; cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina,

55

marcelomicina, nitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; un epotilón; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansine y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procabazina; PSK®; razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2, 2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p.ej. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Se incluyen también en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; siARN y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Se divulgan otros agentes quimioterapéuticos que pueden usarse con la presente invención en la publicación de EE.UU. nº 20080171040o la publicación de EE.UU. nº 20080305044.

En una realización preferida, los fármacos quimioterapéuticos son esencialmente fármacos de molécula pequeña. Un "fármaco de molécula pequeña" se usa ampliamente en la presente memoria para hacer referencia a un compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que puede tener un peso molecular de, por ejemplo, 100 a 1500, más adecuadamente de 120 a 1200, favorablemente de 200 a 1000, y típicamente que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1000. Los fármacos de molécula pequeña de la invención engloban oligopéptidos y otras biomoléculas que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1000. Los fármacos de molécula pequeña están bien caracterizados en la materia, tal como en el documento WO05058367A2, las solicitudes de patente europea nº 85901495 y 8590319 y en la patente de EE.UU. nº 4.956.303, entre otros.

Los fármacos de molécula pequeña preferibles son aquellos que permiten la conexión con el agente de unión celular. La invención incluye fármacos conocidos así como aquellos que pueden hacerse conocidos. Los fármacos de molécula pequeña especialmente preferidos incluyen agentes citotóxicos.

El agente citotóxico puede ser cualquier compuesto que dé como resultado la muerte de una célula o induzca la muerte celular, o de alguna manera disminuya la viabilidad celular, donde cada agente citotóxico comprende un resto tiol.

Los agentes citotóxicos preferidos son compuestos maitansinoides, compuestos de taxano, compuestos de CC-1065, compuestos de daunorubicina y compuestos de doxorubicina, dímeros de pirrolobenzodiacepina y calicheamicinas. Auristatinas y análogos y derivados de las mismas, algunos de los cuales se describen a continuación.

Otros agentes citotóxicos que no son necesariamente moléculas pequeñas, tales como siARN, están también englobados dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los siARN pueden conectarse a los reticulantes de la presente invención mediante procedimientos usados comúnmente para la modificación de oligonucleótidos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. 20050107325 y 20070213292). Por tanto, se hace reaccionar el siARN en su forma 3'- o 5'-fosforamidita con un extremo del reticulante portador de una funcionalidad hidroxilo, dando un enlace éster entre el siARN y el reticulante. De forma similar, la reacción de fosforamidita de siARN con un reticulante portador de un grupo amino terminal da como resultado la conexión del reticulante con el siARN a través de una amina. Los siARN se describen con detalle en los números de publicación de patente de EE.UU.: 20070275465, 20070213292, 20070185050, 20070161595, 20070054279, 20060287260, 20060035254, 20060008822, 20050288244, 20050176667.

60 Maitansinoides

Los maitansinoides que pueden usarse en la presente invención son bien conocidos en la materia y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con procedimientos conocidos o prepararse sintéticamente de acuerdo con procedimientos conocidos.

5

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

- 10 Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen un anillo aromático modificado incluyen:
1. (1) C-19-descloro (patente de EE.UU. nº 4.256.746) (preparado por reducción por LAH de ansamitocina P2);
 2. (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-descloro (patentes de EE.UU. nº 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* descloración usando LAH); y
 3. (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de EE.UU. nº 4.294.757) (preparado por

15

Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen:

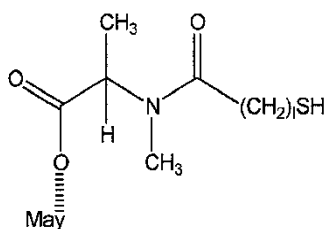
1. (1) C-9-SH (patente de EE.UU. nº 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);
2. (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH₂OR) (patente de EE.UU. nº 4.331.598);
3. (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH₂OH o CH₂OAc) (patente de EE.UU. nº 4.450.254) (preparado a partir de Nocardia);
4. (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. nº 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*);
5. (5) C-15-metoxi (patentes de EE.UU. nº 4.313.946 y 4.315.929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*);
6. (6) C-18-N-desmetilo (patentes de EE.UU. nº 4.362.663 y 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y
7. (7) 4,5-desoxi (patente de EE.UU. nº 4.371.533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

30

La síntesis de maitansinoides que contienen tiol útiles en la presente invención se divulga completamente en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 20040235840.

- 35 Los maitansinoides con un resto tiol en posición C-3, posición C-14, posición C-15 o posición C-20 se espera que sean todos útiles. Se prefiere la posición C-3 y se prefiere especialmente la posición C-3 de maitansinol. Se prefieren también un maitansinoide de resto tiol C-3 que contiene *N*-metilalanina y un maitansinoide de resto tiol C-3 que contiene *N*-metilcisteína y análogos de cada uno.

- 40 Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoides con resto tiol C-3 que contiene *N*-metilalanina útiles en la presente invención se representan por las fórmulas **M1**, **M2**, **M3**, **M6** y **M7**.

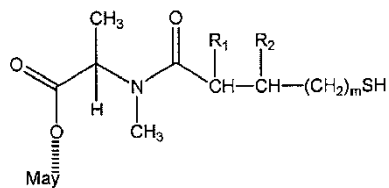
**M1**

45

donde:

l es un entero de 1 a 10; y
 may es un maitansinoide.

50

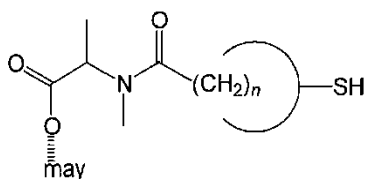


M2

donde:

5

R_1 y R_2 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser iguales o diferentes;
 m es 0, 1, 2 o 3; y
 may es un maitansinoide.

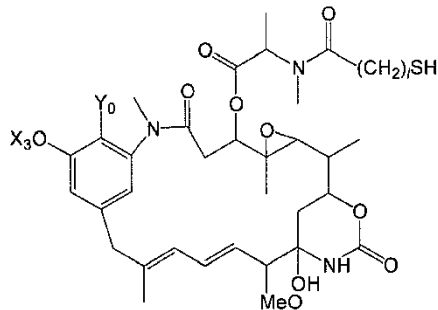


M3

10

donde:

n es un entero de 3 a 8; y
 may es un maitansinoide.



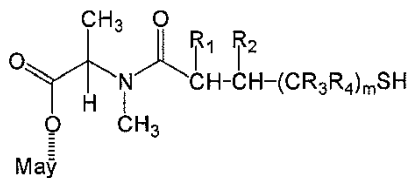
M6

15

donde:

20

l es 1, 2 o 3;
 Y_0 es Cl o H; y
 X_3 es H o CH_3 .



M7

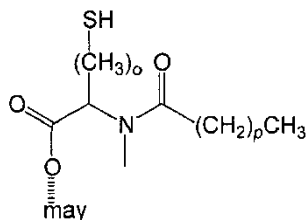
donde:

25

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser iguales o diferentes;
 m es 0, 1, 2 o 3; y
 may es un maitansinoide.

Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene N-metilcisteína útiles en la presente invención se representan por las fórmulas **M4** y **M5**.

5

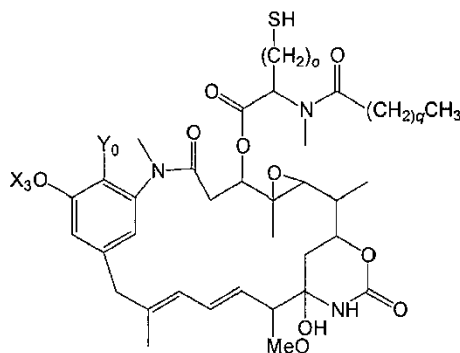


M4

donde:

10

o es 1, 2 o 3;
 p es un entero de 0 a 10; y
 may es un maitansinoide.



M5

15 donde:

o es 1, 2 o 3;
 q es un entero de 0 a 10;
 Y_0 es Cl o H; y
 X_3 es H o CH₃.

20

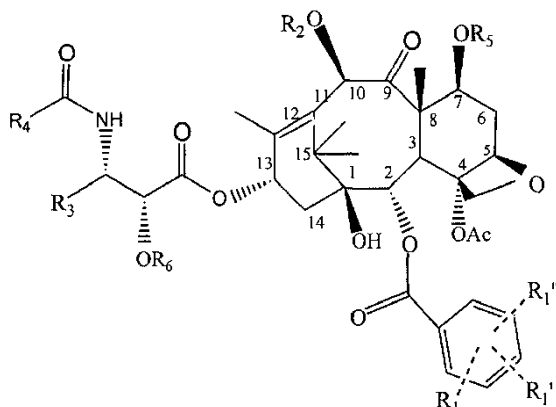
Son maitansinoides preferidos aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020; 5.416.064; 6.333.410; 6.441.163; 6.716.821; RE39.151 y 7.276.497.

25 **Taxanos**

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención puede ser también un taxano.

Los taxanos que pueden usarse en la presente invención se han modificado para contener un resto tiol. Algunos taxanos útiles en la presente invención tienen la fórmula **T1** mostrada a continuación:

30



T1

Se describen a continuación 4 realizaciones de estos taxanos novedosos.

- 5 En las realizaciones (1), (2), (3) y (4), R_1 , R_1' y R_1'' son iguales o diferentes y son H, un grupo atractor de electrones tal como F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , o CF_3 o un grupo donante de electrones tal como $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{NR}_7\text{R}_8$, $-\text{OR}_9$, donde R_7 y R_8 son iguales o diferentes y son grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que tienen de 1 a 10 átomos de carbono o arilo sencillo o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, el número de átomos de carbono para R_7 y R_8 es de 1 a 4. También, preferiblemente R_7 y R_8 son iguales. Los ejemplos de grupos $-\text{NR}_7\text{R}_8$ preferidos incluyen dimetilamino, dietilamino, dipropilamino y dibutilamino, donde el resto butilo es cualquiera de primario, secundario, terciario o isobutilo. R_9 es alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

R_1 es preferiblemente OCH_3 , F, NO_2 o CF_3 .

- 15 También, preferiblemente R_1 está en posición meta y R_1' y R_1'' son H u OCH_3 .

R_2 en las realizaciones (1), (2) y (4) es H, un éster heterocíclico, lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un éter heterocíclico, lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o carbamato de fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, donde R_{10} y R_{11} son iguales o diferentes y son H, alquilo lineal que tiene 1-6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 10 átomos o arilo sencillo o sustituido que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. Para ésteres, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Para éteres, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Para carbamatos, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO}$ -morfolino, $-\text{CO}$ -piperazino, $-\text{CO}$ -piperidino o $-\text{CO}$ -*N*-metilpiperazino.

- 25 R_2 en la realización (3) es un resto que contiene tiol.

R_3 en las realizaciones (1), (3) y (4) es arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

- 30 R_3 en la realización (2) es $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

R_4 en las cuatro realizaciones es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}_6\text{H}_5$.

- 35 R_5 en las realizaciones (1) y (2) es un resto que contiene tiol y R_6 tiene la misma definición que anteriormente para R_2 en las realizaciones (1), (2) y (4).

R_5 y R_6 en la realización (3) son iguales o diferentes y tienen la misma definición que anteriormente para R_2 en las realizaciones (1), (2) y (4).

- 40 R_5 en la realización (4) tiene la misma definición que anteriormente para R_2 en las realizaciones (1), (2) y (4), y R_6 es un resto tiol.

Las posiciones preferidas para la introducción del resto que contiene tiol son R_2 y R_5 , siendo R_2 la más preferida.

- 45 La cadena lateral portadora del resto tiol puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Un especialista en

la materia puede identificar fácilmente las cadenas laterales adecuadas. Los ejemplos específicos de restos tiol incluyen $-(CH_2)_nSH$, $-CO(CH_2)_nSH$, $-(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-CO(CH_2)_nCH(CH_3)SH$, $-(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CO(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CONR_{12}(CH_2)_nSH$, $-CONR_{12}(CH_2)_nCH(CH_3)SH$ o $-CONR_{12}(CH_2)_nC(CH_3)_2SH$, $-CO$ -morfolino-XSH, $-CO$ -piperazino-XSH, $-CO$ -piperidino-XSH y $-CO$ -*N*-metilpiperazino-XSH donde

5 X es un alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono.

R_{12} es un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o arilo sencillo o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico, puede ser H y

n es un entero de 0 a 10.

10 Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etilpropilo.

Los ejemplos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

15

Los ejemplos de arilos sencillos incluyen fenilo y naftilo.

Los ejemplos de arilos sustituidos incluyen arilos tales como los descritos anteriormente sustituidos con grupos alquilo, con halógenos tales como Cl, Br y F, grupos nitro, grupos amino, grupos ácido sulfónico, grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo o grupos alcoxi.

20

Los ejemplos de heterociclos son compuestos donde los heteroátomos se seleccionan de entre O, N y S e incluyen morfolino, piperidino, piperazino, *N*-metilpiperazino, pirrolilo, piridilo, furilo y tiofeno.

25 Los taxanos que tienen un resto tiol pueden sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos. El material de partida para la síntesis es la 10-desacetilbacatina III comercialmente disponible. La química de introducir diversos sustituyentes se describe en varias publicaciones (Ojima y col., J. Med. Chem. 39: 3889-3896 (1996); Ojima y col., J. Med. Chem. 40: 267-278 (1997); Ojima y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 96: 4256-4261 (1999); patente de EE.UU. nº 5.475.011 y patente de EE.UU. nº 5.811.452).

30

El sustituyente R_1 en el anillo fenilo y la posición del sustituyente R_1 pueden variar hasta obtener un compuesto de la toxicidad deseada. Además, el grado de sustitución en el anillo fenilo puede variar para conseguir la toxicidad deseada. Es decir, el anillo fenilo puede tener uno o más sustituyentes (p.ej., mono-, di- o trisustitución del anillo fenilo) que proporcionan otro medio para conseguir la toxicidad deseada. Un especialista en la materia puede determinar el resto químico apropiado para R_1 y la posición apropiada para R_1 usando solo experimentación rutinaria.

35

Por ejemplo, los grupos atractores de electrones en la posición meta aumentan la potencia citotóxica, mientras que la sustitución en posición para no se espera que aumente la potencia en comparación con el taxano original. Típicamente, se prepararán inicialmente unos pocos taxanos representativos con sustituyentes en las diferentes posiciones (orto, meta y para) y se evaluará la citotoxicidad *in vitro*.

40

El resto tiol puede introducirse en una de las posiciones donde existe ya un grupo hidroxilo. La química para proteger los diversos grupos hidroxilo, mientras reacciona el deseado se ha descrito anteriormente (véanse, por ejemplo, las referencias citadas *supra*). El sustituyente se introduce convirtiendo sencillamente el grupo hidroxilo libre en un éter que contiene disulfuro, un éster que contiene disulfuro o un carbamato que contiene disulfuro. Esta transformación se consigue como sigue: Se desprotona el grupo hidroxilo deseado mediante tratamiento con el reactivo comercialmente disponible hexametildisilazano de litio (1,2 equivalentes) en tetrahidrofurano a -40°C como se describe en Ojima y col. (1999), *supra*. Se hace reaccionar entonces el anión alcóxido resultante con un exceso de un compuesto dihalogenado, tal como dibromoetano, dando un halogenoéter. El desplazamiento del halógeno por un tiol (mediante reacción con tioacetato de potasio y tratamiento con base débil o hidroxilamina) proporcionará el taxano que contiene tiol deseado.

50

Como alternativa, el grupo hidroxilo deseado puede esterificarse directamente mediante reacción con un haluro de acilo, tal como cloruro de 3-bromopropionilo, dando un bromoéster. El desplazamiento del grupo bromo por tratamiento con tioacetato de potasio y procesamiento adicional como se describe anteriormente proporcionará el éster de taxano que contiene tiol. Son taxoides preferidos aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.340.701; 6.372.738; 6.436.931; 6.596.757; 6.706.708; 7.008.942; 7.217.819 y 7.276.499.

55

Análogos de CC-1065

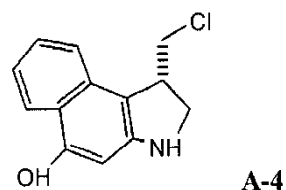
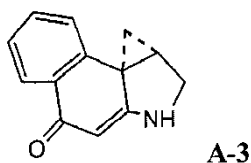
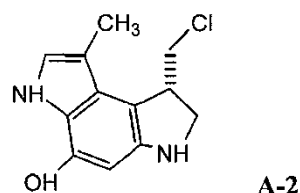
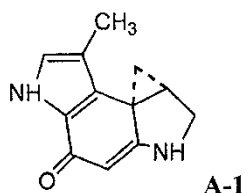
60

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención puede ser también un análogo de CC-1065.

De acuerdo con la presente invención, los análogos de CC-1065 contienen una subunidad A y una subunidad B o B-C. Las subunidades A son CPI (unidad de ciclopropapirrolindol) en su forma ciclopropilo cerrada natural o en su forma clorometilo abierta, o la unidad CBI (unidad de ciclopropilbencindol) estrechamente relacionada en la forma ciclopropilo cerrada o la forma clorometilo abierta. Las subunidades B y C de los análogos de CC-1065 son muy similares y son derivados de 2-carboxiindol y 2-carboxibenzofurano. Para la actividad, los análogos de CC-1065 necesitan al menos una de dichas subunidades de 2-carboxiindol o subunidades de 2-carboxibenzofurano, aunque dos subunidades (es decir, B-C) vuelven más potente el análogo. Como es obvio a partir del CC-1065 natural y a partir de los análogos publicados (*p.ej.*, Warpehosi y col. J. Med. Chem. 31: 590-603 (1988), D. Boger y col., J. Org. Chem; 66; 6654-6661, 2001; patentes de EE.UU. nº 5.739.350; 6.060.608; 6.310.209), las subunidades B y C pueden portar también diferentes sustituyentes en posiciones diferentes de los anillos de indol o benzofurano.

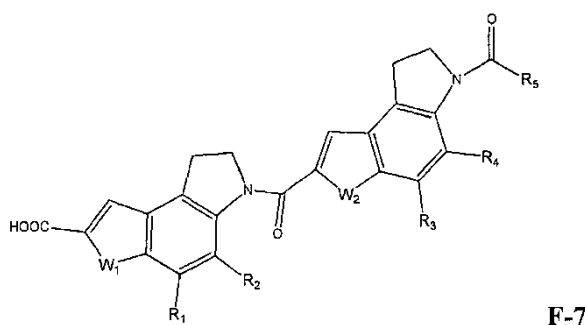
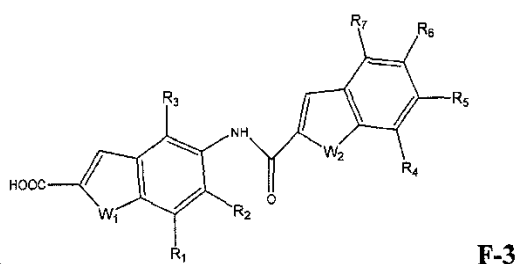
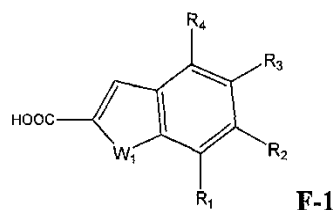
Los análogos de CC-1065 que contienen un resto tiol pueden ser cualquiera de las siguientes subunidades A de fórmulas **A-1**{CPI (forma ciclopropilo)}, **A-2**{CPI (forma clorometilo)}, **A-3**{CBI (forma ciclopropilo)}, y **A-4**{CBI (forma clorometilo)} conectadas covalentemente a través de un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A al grupo carboxi C-2 de una subunidad B de fórmula **F-1** o bien una subunidad B-C de fórmulas **F-3** o **F-7**.

20 Subunidades A



25

Subunidades B y B y C unidas covalentemente



30

donde cada W_1 y W_2 pueden ser iguales o diferentes y pueden ser O o NH; y donde, en la Fórmula **F-1** R_4 es un resto tiol, en la Fórmula **F-3** uno de R o R_4 es un resto tiol, en la Fórmula **F-7** uno de R' o R_4 es un resto que contiene tiol; cuando R o R' son un resto tiol, entonces R_1 a R_6 , que pueden ser iguales o diferentes, son hidrógeno, alquilo C_1 - C_3 lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R_4 es un resto tiol, R, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 , que pueden ser iguales o diferentes, son hidrógeno, alquilo C_1 - C_3 lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido, y R' es NH_2 , alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido. Además, el átomo de cloro en las subunidades A-2 y A-4 puede reemplazarse por otro halógeno adecuado.

En una realización preferida, R y R' son restos tiol y R_1 y R_2 son cada uno hidrógeno. En otra realización preferida, R y R' son restos tiol y R_1 a R_6 son cada uno hidrógeno.

En una realización especialmente preferida, R o R_4 es $-NHCO(CH_2)_lSH$, $-NHCOC_6H_4(CH_2)_lSH$ u $-O(CH_2)_lSH$, y R' es $-(CH_2)_lSH$, $-NH(CH_2)_lSH$ o $-O(CH_2)_lSH$ donde l es un entero de 1 a 10.

Los ejemplos de aminas primarias incluyen metilamina, etilamina e isopropilamina.

Los ejemplos de aminas secundarias incluyen dimetilamina, dietilamina y etilpropilamina.

Los ejemplos de aminas terciarias incluyen trimetilamina, trietilamina y etilisopropilmetilamina.

Los ejemplos de grupos amido incluyen N-metilacetamido, N-etilpropionamido, N-acetamido y N-propionamido.

Los ejemplos de alquilo representados por R' , cuando R' no es un grupo conector, incluyen alquilo C_1 - C_5 lineal o ramificado.

Los ejemplos de O-alquilo representados por R' cuando R' no es un grupo conector incluyen compuestos donde el resto alquilo es un alquilo C_1 -5 lineal o ramificado.

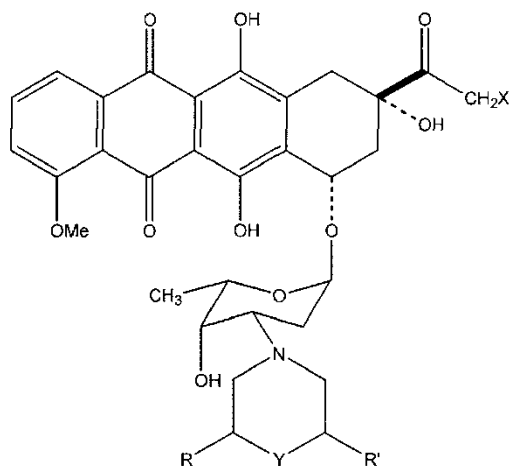
Los análogos de CC-1065 anteriormente descritos pueden aislarse a partir de fuentes naturales y los procedimientos para su preparación, que implican la posterior modificación, preparación sintética o combinación de ambas, están bien descritos (véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. nº 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545). Son análogos de CC-1065 preferidos aquellos descritos en las patentes de EE.UU. nº 5.475.092; 5.595.499; 5.846.545; 6.534.660; 6.586.618; 6.756.397 y 7.049.316.

Análogos de daunorubicina/doxorubicina

El agente citotóxico de acuerdo con la presente invención puede ser también un análogo de daunorubicina o un análogo de doxorubicina.

Los análogos de daunorubicina o doxorubicina de la presente invención pueden modificarse para comprender un resto tiol.

Los análogos de doxorubicina/daunorubicina modificados útiles en la presente invención tienen la fórmula **D1** mostrada a continuación:



donde,

X es H u OH;

- 5 Y es O o NR₂, donde R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono;
 R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono; y
 R' es un resto tiol, H u OR₁, donde R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono;
 a condición de que R y R' no sean restos tiol al mismo tiempo.

10

En una realización preferida, NR₂ es NCH₃. En otra realización preferida, R' es -O.

En una realización especialmente preferida, el resto tiol es -(CH₂)_nSH, -O(CH₂)_nSH, -(CH₂)_nCH(CH₃)SH, -O(CH₂)_nCH(CH₃)SH, -(CH₂)_nC(CH₃)₂SH o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂SH, donde n es un entero de 0 a 10.

15

Los ejemplos de alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, representados por R, R₁ y R₂, incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo y pentilo en cualquiera de sus ocho disposiciones isoméricas.

20 R₁ y R₂ son preferiblemente metilo.

Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etilpropilo.

25

Cuando cualquiera de R o R' no sea un grupo conector, el sustituyente en esa posición puede variar hasta obtener un compuesto de la toxicidad deseada. La alta toxicidad se define como tener una CI₅₀ hacia células cancerosas cultivadas en el intervalo de 1 x 10⁻¹² a 1 x 10⁻⁹ M, tras un tiempo de exposición de 72 horas. Son ejemplos representativos de sustituyentes H, alquilo y O-alquilo, como se describen anteriormente. Un especialista en la materia

30

puede determinar el resto químico apropiado para R y R' usando solo experimentación rutinaria.

Por ejemplo, se espera que los sustituyentes metilo y metoxi aumenten la potencia citotóxica, mientras que no se espera que un hidrógeno aumente la potencia en comparación con los análogos de daunorubicina original con sustituyentes en las diferentes posiciones que se prepararán inicialmente y se evaluará la citotoxicidad *in vitro*.

35

Los análogos de doxorubicina/daunorubicina modificados de la presente invención, que tienen un resto tiol, se describen en el documento WO 01/38318. Los análogos de doxorubicina/daunorubicina modificados pueden sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos (véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº 5.146.064).

40

Las auristatinas incluyen auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometilauristatina E (MMAE) y se describen en la patente de EE.UU. nº 5.635.483, Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, nº 8, pág. 921-932 (2004); solicitud de EE.UU. número 11/134826. Publicaciones de patente de EE.UU. nº 20060074008, 2006022925.

[0135] Los agentes citotóxicos de acuerdo con la presente invención incluyen dímeros de pirrolobenzodiacepina que son conocidos en la materia (patentes de EE.UU. nº 7.049.311;7.067.511;6.951.853;7.189.710;6.884.799;6.660.856.

Análogos y derivados

5

Un especialista en la materia de los agentes citotóxicos entenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria puede modificarse de tal manera que el compuesto resultante siga reteniendo la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El especialista en la materia entenderá también que muchos de estos compuestos pueden usarse en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria. Por tanto, los

10 agentes citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente memoria.

Uso terapéutico

15 Los conjugados de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) de esta invención pueden usarse también en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Se enumeran o se describen anteriormente tales agentes quimioterapéuticos en la patente de EE.UU. nº 7.303.749.

Los conjugados de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) de la presente invención pueden administrarse in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar pacientes y/o para modular el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, sangre, plasma, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, cerebro, hueso, ovario, testículo y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunitarias tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiples; rechazo de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad del

20 hospedador frente al injerto, infecciones víricas tales como infección por CMV, infección por VIH y SIDA e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y similares. Preferiblemente, los inmunoconjugados y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran in vitro, in vivo y/o ex vivo para tratar cáncer en un paciente y/o para modular el crecimiento de células cancerosas incluyendo, por ejemplo, cáncer de sangre, plasma, pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, cerebro, hueso, ovario, testículo y órganos linfáticos; más preferiblemente

25 cáncer de pulmón, colon, próstata, plasma sangre o colon.

"Modular el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas" incluye inhibir la proliferación de poblaciones celulares seleccionadas (p.ej., poblaciones celulares de mieloma múltiple tales como células MOLP-8, células OPM2, células H929 y similares) por división para producir más células; reducir la tasa de aumento de la división celular en

30 comparación con, por ejemplo, células no tratadas; matar poblaciones celulares seleccionadas y/o prevenir que metastaticen poblaciones celulares seleccionadas (tales como células cancerosas). El crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede modularse in vitro, in vivo o ex vivo.

En los procedimientos de la presente divulgación, los conjugados de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) pueden administrarse in vitro, in vivo o ex vivo. Los conjugados de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) pueden usarse con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, que son bien conocidos, y pueden determinarse por un especialista en la materia según justifique la situación clínica. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 6,5, que contendría aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml

45 de seroalbúmina humana, (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9 % p/v) y (3) dextrosa al 5 % (p/v).

Los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse en forma apropiada, preferiblemente parenteral, más preferiblemente intravenosa. Para administración parenteral, los compuestos o composiciones pueden ser soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Pueden usarse

50 como disolvente o vehículo propilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Las composiciones pueden contener también coadyuvantes, emulsionantes o dispersantes.

Las composiciones pueden estar también en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril o cualquier otro medio estéril inyectable.

55

La "cantidad terapéuticamente efectiva" del conjugado de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) descrito en la presente memoria hace referencia al régimen de dosificación para modular el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas y/o tratar la enfermedad de un paciente, y se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo edad, peso, sexo, dieta y estado médico del paciente, gravedad de la enfermedad, vía de

60 administración y consideraciones farmacológicas tales como actividad, efectividad, perfiles farmacocinético y

toxicológico del compuesto particular usado. La "cantidad terapéuticamente efectiva" puede determinarse también por referencia a textos médicos estándares, tales como el Physician's Desk Reference 2004. El paciente es preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, lo más preferiblemente un ser humano. El paciente puede ser masculino o femenino, y puede ser un bebé, niño o adulto.

5

Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados de agente de unión celular-fármaco (p.ej., inmunoconjugados) son como sigue: Los conjugados pueden procurarse diariamente durante aproximadamente 5 días en forma de un bolo i.v. cada día durante aproximadamente 5 días o en forma de una infusión continua durante aproximadamente 5 días.

10

Como alternativa, los conjugados pueden administrarse una vez por semana durante 6 semanas o más. Como otra alternativa, los conjugados pueden administrarse una vez cada dos o tres semanas. Las dosis en bolo se procuran con aproximadamente 50 a aproximadamente 400 ml de solución salina normal a la que pueden añadirse aproximadamente 5 a aproximadamente 10 ml de seroalbúmina humana. Se procuran infusiones continuas de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 ml de solución salina normal, a la que pueden añadirse aproximadamente 25 a aproximadamente 50 ml de seroalbúmina humana por periodo de 24 horas. Las dosificaciones serán de aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1000 mg/kg por persona i.v. (intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 100 mg/kg).

15

20 Aproximadamente 1 a aproximadamente 4 semanas después del tratamiento, el paciente puede recibir una segunda tanda de tratamiento. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones y tiempos pueden determinarse por el especialista en la materia según justifique la situación clínica.

25 La presente divulgación proporciona también kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases rellenos con uno o más de los ingredientes de los compuestos y/o composiciones farmacéuticos de la presente divulgación, incluyendo uno o más inmunoconjugados y uno o más agentes quimioterapéuticos. Tales kits pueden incluir también, por ejemplo, otros compuestos y/o composiciones, un dispositivo o dispositivos para administrar los compuestos y/o composiciones e instrucciones escritas en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

30

Los compuestos y conjugados (p.ej. inmunoconjugados) podrían usarse también para la fabricación de un medicamento útil para tratar o rebajar la gravedad de trastornos tales como los caracterizados por un crecimiento anormal de células (p.ej., cáncer).

35

Las terapias del cáncer y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado son conocidos en la materia y se han descrito en bibliografías tales como el Physician's Desk Reference (PDR). El PDR divulga las dosificaciones de agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y dosificaciones de estos agentes quimioterapéuticos y conjugados anteriormente mencionados que son terapéuticamente efectivos dependerán del cáncer particular que se esté tratando, de la extensión de la enfermedad y de otros factores con los que está familiarizado el especialista en la materia y que pueden determinarse por el médico. Por ejemplo, la edición de 2006 del Physician's Desk Referencia divulga que Taxotere (véase la pág. 2947) es un inhibidor de la despolimerización de tubulina; doxorubicina (véase la pág. 786), Doxil (véase la pág. 3302) y oxaliplatino (véase la pág. 2908) son agentes de interacción con ADN, irinotecal (véase la pág. 2602) es un inhibidor de topoisomerasa I, Erbitux (véase la pág. 937) y Tarceva (véase la pág. 2470) interaccionan con el receptor de factor de crecimiento epidérmico. Un especialista en la materia puede revisar el PDR, usando uno o más de los siguientes parámetros, para determinar los regímenes de dosificación y dosificaciones de los agentes quimioterapéuticos y conjugados que pueden usarse de acuerdo con las enseñanzas de esta invención. Estos parámetros incluyen:

40

1. Índice integral

50

1. a) por fabricante
2. b) productos (por compañía o nombre de fármaco registrado)
3. c) índice de categoría (por ejemplo, "antihistamínicos", "agentes alquilantes de ADN", taxanos, etc.)
4. d) índice genérico/químico (nombres de fármaco comunes no registrados)

2. Imágenes en color de medicaciones

55

3. Información de producto consistente con el etiquetado de la FDA

1. a) Información química
2. b) Función/acción
3. c) Indicaciones y contraindicaciones
4. d) Investigación del ensayo, efectos secundarios, advertencias

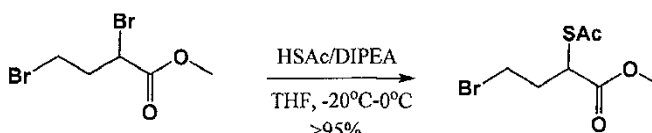
60

EJEMPLOS

La investigación se describirá ahora por referencia a ejemplos no limitantes. A menos que se especifique otra cosa, todos los porcentajes y relaciones son en volumen.

5 Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

2-(Acetiltio)-4-bromobutanoato de metilo

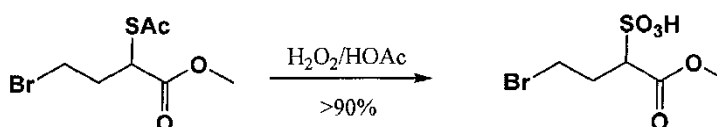


10

Se añadió gota a gota la mezcla de 2,75 ml (38,5 mmol) de ácido tioacético en 8,5 ml (48,9 mmol) de DIPEA y 50 ml de THF seco durante 1,5 h a 10,0 g (38,4 mmol) de 2,4-dibromobutanoato de metilo en 100 ml de THF seco a 20 °C. Después de agitar durante una noche a -20 °C y entonces a 0 °C durante 2 horas bajo Ar, se concentró la mezcla, se diluyó con EtAc/hexano, se lavó con NaH_2PO_4 1,0 M, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se evaporó y se sometió a purificación cromatográfica con SiO_2 (EtAc/hexano 1:10), procurando 9,5 g (96 %) del compuesto del título. RMN-1H (CDCl₃) 4,38 (1H, t, J= 7,1Hz), 3,74 (s, 3H), 3,40 (m, 2H), 2,57~2,47 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,36~2,21 (m, 1H); RMN-13C 193,24, 171,36, 53,15, 44,45, 34,67, 30,46, 29,46; MS m/z+ 276,9 (M+Na), 278,9 (M+2+Na)

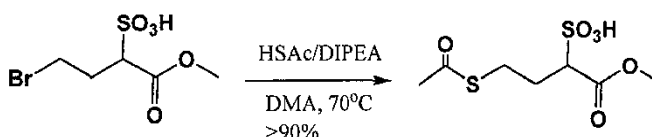
Ácido 4-bromo-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico

20



Se añadieron 40 ml de peróxido de hidrógeno (al 35 % en agua) a 9,2 g (36,3 mmol) de 2-(acetiltio)-4-bromobutanoato de metilo en 80 ml de ácido acético. Se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó entonces, se diluyó con agua, se neutralizó con NaHCO_3 y se lavó con hexano/EtAc 1:1. Se evaporó la solución acuosa, se disolvió en metanol, se concentró y se cristalizó con metanol/tolueno, procurando 8,6 g (90 % de rendimiento) del compuesto del título. P.f. = 288~293 (descomp); RMN-1H (D₂O) 4,12 (dd, 1H, J= 4,8, 9,3 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 2,54 (m, 2H); RMN-13C 172,16, 66,73, 55,66, 33,39, 32,70; MS m/z- 260,8 (M-1).

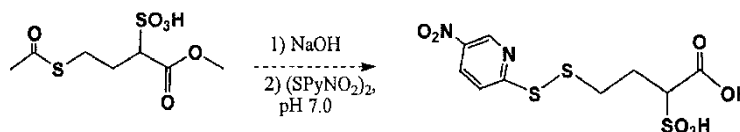
30 Ácido 4-(acetiltio)-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico



Se añadieron 3,0 ml de ácido tioacético y 9,0 ml de DIPEA en 100 ml de THF a 5,0 g (19,2 mmol) de ácido 4-bromo-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico en 100 ml de THF. Se agitó la mezcla durante una noche y se calentó entonces a reflujo a 70 °C durante 1 h, se evaporó y se coevaporó con 3 x 100 ml de agua después de neutralizar a pH 7 con NaHCO_3 . Se redisolvió la mezcla en metanol, se filtró a través de Celite y se purificó por cromatografía con SiO_2 eluida con $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HCOOH}$ 37,5:250:1 a 50:250:1, procurando 4,4 g (90 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (D₂O) 3,95 (dd, 1H, J= 4,1, 10,3 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,74 (m, 2H), 3,22 (dd, 2H, J= 7,4, 14,9 Hz), 2,39 (s, 3H); RMN-13C 203,88, 172,91, 67,32, 56,17, 29,04, 20,61; MS m/z- 254,8 (M-H)

40

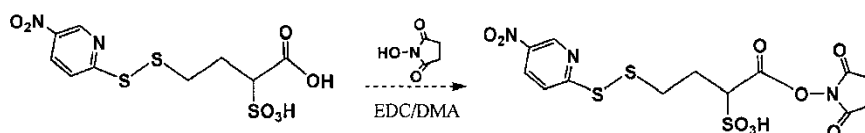
Ácido 4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-2-sulfobutanoico



45

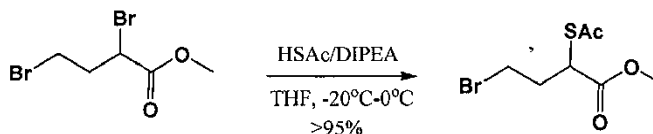
Se añadieron 50 ml de NaOH 3 M a 3,0 g (11,7 mmol) de ácido 4-(acetiltio)-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico en 100 ml de agua. Después de agitar bajo Ar durante 3 h, se neutralizó la mezcla con H_2PO_4 1 M a pH 7,2 bajo Ar. Se añadió la mezcla gota a gota a una solución de 10,0 g (32,2 mmol) de 1,2-bis(5-nitropiridin-2-il)disulfano en 200 ml de DMA. Después de agitar durante 4 h bajo Ar, se concentró la mezcla, se diluyó con agua, se filtró, se evaporó y se purificó con una columna C-18 de 4,0 x 20 cm eluida con agua/metanol (95:5), procurando 3,1 g (75 % de rendimiento) del compuesto del título. P.f. = 288~291 °C (descomp.) RMN-1H (DMF-d7) 9,29 (d, 1H, J= 2,2 Hz), 8,63 (dd, 1H, J= 2,7, 8,9 Hz), 8,17 (d, 1H, J= 8,9 Hz), 3,73 (t, 1H, J= 7,2 Hz), 3,22~3,17 (m, 1H), 3,15~3,10 (m, 1H), 2,41~2,33 (m, 2H); RMN-13C 170,92, 169,10, 146,04, 143,67, 133,65, 120,72, 64,22, 37,82, 29,26; MS m/z- 352,8 (M-H).

10 Ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-1-oxobutano-2-sulfónico



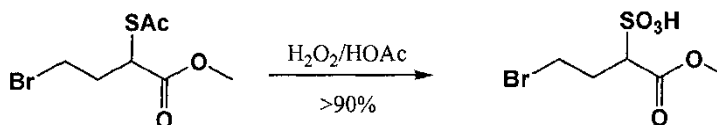
Se añadieron 130 mg (1,13 mmol) de NHS y 480 mg (2,50 mmol) de EDC a 220 mg (0,62 mmol) de ácido 4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-2-sulfobutanoico en DMA 15. Se agitó la mezcla bajo Ar durante un anoche, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO_2 eluida con $\text{CH}_2\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ (10000:1000:1 a 10000:1500:1), procurando 227 mg (82 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (DMSO-d6) 9,25 (d, 1H, J= 5,2 Hz), 8,57 (dd, 1H, J= 2,5, 8,9 Hz), 8,04 (t, 1H, J= 8,0 + 8,9 Hz), 3,86 (dd, 1H, J= 4,9, 9,7 Hz), 3,13~3,12 (m, 2H), 2,76 (s, 4H), 2,36~2,30 (m, 1H), 2,25~2,21 (m, 1H); RMN-13C 166,96, 165,01, 144,93, 142,26, 132,63, 119,61, 61,00, 35,03, 29,30, 25,39; MS m/z- 449,8 (M-H).

2-(Acetiltio)-4-bromobutanoato de metilo



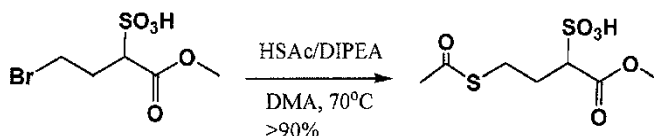
Se añadió gota a gota una mezcla de 2,75 ml (38,5 mmol) de ácido tiolacético en 8,5 ml (48,9 mmol) de DIPEA y 50 ml de THF seco durante 1,5 h a 10,0 g (38,4 mmol) de 2,4-dibromobutanoato de metilo en 100 ml de THF seco a 20 °C. Después de agitar durante una noche a -20 °C y entonces a 0 °C durante 2 horas bajo Ar, se concentró la mezcla, se diluyó con EtAc/hexano, se lavó con NaH_2PO_4 1,0 M, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se evaporó y se sometió a purificación cromatográfica con SiO_2 (EtAc/hexano de 1:12 a 1:10), procurando 9,5 g (96 %) del compuesto del título. RMN-1H (CDCl_3) 4,38 (1H, t, J= 7,1Hz), 3,74 (s, 3H), 3,40 (m, 2H), 2,57~2,47 (m, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,36~2,21 (m, 1H); RMN-13C 193,24, 171,36, 53,15, 44,45, 34,67, 30,46, 29,46; MS m/z+ 276,9 (M+Na), 278,9 (M+2+Na).

Ácido 4-bromo-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico



Se añadieron 40 ml de peróxido de hidrógeno (al 35 % en agua) a 9,2 g (36,3 mmol) de 2-(acetiltio)-4-bromobutanoato de metilo en 80 ml de ácido acético. Se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó entonces, se diluyó con agua, se neutralizó con NaHCO_3 y se lavó con hexano/EtAc 1:1. Se evaporó la solución acuosa, se disolvió en metanol, se concentró y se cristalizó con metanol/tolueno, procurando 8,6 g (90 % de rendimiento) del compuesto del título. P.f. = 288~293 (descomp); RMN-1H (D_2O) 4,12 (dd, 1H, J= 4,8, 9,3 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,64 (m, 1H), 3,53 (m, 1H), 2,54 (m, 2H); RMN-13C 172,16, 66,73, 55,66, 33,39, 32,70; MS m/z- 260,8 (M-1).

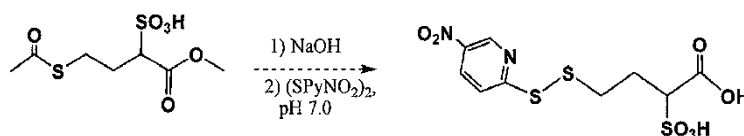
45 Ácido 4-(acetiltio)-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico



Se añadieron 3,0 ml de ácido tioacético y 9,0 ml de DIPEA en 100 ml de THF a 5,0 g (19,2 mmol) de ácido 4-bromo-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico en 100 ml de THF. Se agitó la mezcla durante una noche y se calentó entonces a reflujo a 70 °C durante 1 h, se evaporó y se coevaporó con 3 x 100 ml de agua después de neutralizar a pH 7 con NaHCO₃. Se redisolvió la mezcla en metanol, se filtró a través de Celite y se purificó por cromatografía con SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HCOOH 37,5:250:1 a 50:250:1), procurando 4,4 g (90 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (D₂O) 3,95 (dd, 1H, J= 4,1, 10,3 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,74 (m, 2H), 3,22 (dd, 2H, J= 7,4, 14,9 Hz), 2,39 (s, 3H); RMN-13C 203,88, 172,91, 67,32, 56,17, 29,04, 20,61; MS m/z- 254,8 (M-H).

10

Ácido 4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-2-sulfobutanoico

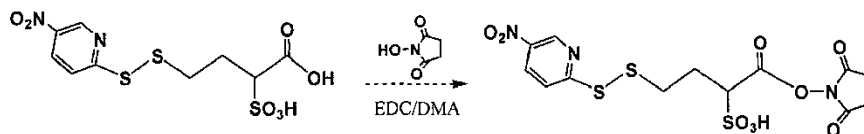


15 Se añadieron 50 ml de NaOH 3 M a 3,0 g (11,7 mmol) de ácido 4-(acetiltilio)-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico en 100 ml de agua. Después de agitar bajo Ar durante 3 h, se neutralizó la mezcla con H₂PO₄ 1 M a pH 7,2 bajo Ar. Se añadió la mezcla gota a gota a una solución de 10,0 g (32,2 mmol) de 1,2-bis(5-nitropiridin-2-il)disulfano en 200 ml de DMA. Después de agitar durante 4 h bajo Ar, se concentró la mezcla, se diluyó con agua, se filtró, se evaporó y se purificó con una columna C-18 de 4,0 x 20 cm eluida con agua/metanol (95:5), procurando 3,1 g (75 % de rendimiento) del compuesto del título. P.f. = 288~291 °C (descomp.) RMN-1H (DMF-d₇) 9,29 (d, 1H, J= 2,2 Hz), 8,63 (dd, 1H, J= 2,7, 8,9 Hz), 8,17 (d, 1H, J= 8,9 Hz), 3,73 (t, 1H, J= 7,2 Hz), 3,22~3,17 (m, 1H), 3,15~3,10 (m, 1H), 2,41~2,33 (m, 2H); RMN-13C 170,92, 169,10, 146,04, 143,67, 133,65, 120,72, 64,22, 37,82, 29,26; MS m/z- 352,8 (M-H).

20

Ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-1-oxobutano-2-sulfónico

25

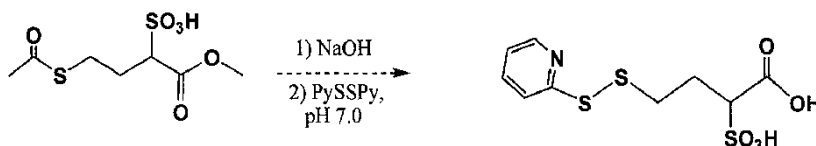


Se añadieron 130 mg (1,13 mmol) de NHS y 480 mg (2,50 mmol) de EDC a 220 mg (0,62 mmol) de ácido 4-((5-nitropiridin-2-il)disulfanil)-2-sulfobutanoico en DMA 15. Se agitó la mezcla bajo Ar durante un anoche, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₂CH₂/CH₃OH/HCOOH (10000:1000:1 a 10000:1500:1), procurando 227 mg (82 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (DMSO-d₆) 9,25 (d, 1H, J= 5,2 Hz), 8,57 (dd, 1H, J= 2,5, 8,9 Hz), 8,04 (t, 1H, J= 8,0 + 8,9 Hz), 3,86 (dd, 1H, J= 4,9, 9,7 Hz), 3,13~3,12 (m, 2H), 2,76 (s, 4H), 2,36~2,30 (m, 1H), 2,25~2,21 (m, 1H); RMN-13C 166,96, 165,01, 144,93, 142,26, 132,63, 119,61, 61,00, 35,03, 29,30, 25,39; MS m/z- 449,8 (M-H).

30

35

Ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico



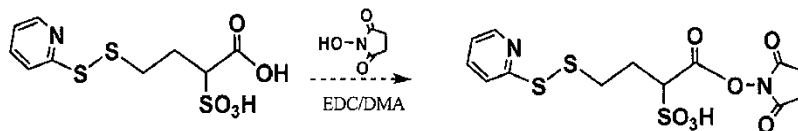
40 Se añadieron 1,5 g (5,85 mmol) de ácido 4-(acetiltilio)-1-metoxi-1-oxobutano-2-sulfónico a 100 ml de solución de NaOH 0,5 M. Después de concentrar bajo Ar durante 3 h, se concentró la mezcla a ~50 ml y se neutralizó con H₂PO₄ 1 M a pH 7,2 bajo Ar. Se añadió gota a gota la mezcla a una solución de 4,0 g (18,1 mmol) de 2,2'-ditiodipiridina en 60 ml de DMA. Después de agitar durante 4 h bajo Ar, se concentró la mezcla, se diluyó con agua, se filtró, se evaporó y se purificó con una columna C-18 de 4,0 x 20 cm eluida con agua/metanol (99:1 a 90:10), procurando 1,32 g (73 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (DMF-d₇) 8,39 (dd, 1H, J= 3,5, 4,8 Hz), 7,86 (m, 2H), 7,25 (m, 1H),

45

3,59 (dd, 1H, J= 5,2, 9,4 Hz), 2,90 (m, 2H), 2,28 (m, 2H); RMN-13C 172,60, 159,16, 148,93, 138,09, 121,03, 119,38, 67,49, 36,39, 28,666; MS m/z- 307,8 (M-H).

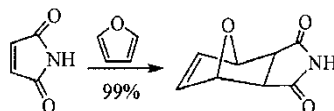
Ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butano-2-sulfónico

5



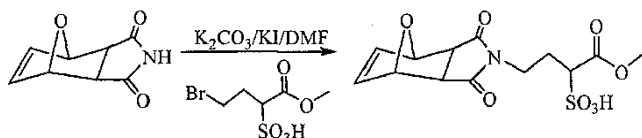
Se añadieron 300 mg (2,60 mmol) de NHS y 800 mg (4,16 mmol) de EDC a 680 mg (2,20 mmol) de ácido 4-(piridin-2-ildisulfanil)-2-sulfobutanoico en DMA 50. Se agitó la mezcla bajo Ar durante una noche, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₂CH₂/CH₃OH/HCOOH (10000:1000:1 a 10000:1500:1), procurando 720 mg (80 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-1H (DMSO-d₆) 8,40 (dd, 1H, J= 3,5, 4,7 Hz), 7,85 (m, 2H), 7,24 (m, 1H), 3,58 (dd, 1H, J= 5,1, 9,4 Hz), 2,94~2,90 (m, 2H), 2,74 (s, 4H), 2,31~2,27 (m, 2H); RMN-13C 168,16, 161,11, 147,91, 139,22, 121,63, 119,31, 66,80, 36,30, 28,36, 25,42; MS m/z- 404,9 (M-H).

15 3,6-Endoxo-Δ-tetrahydroftalida



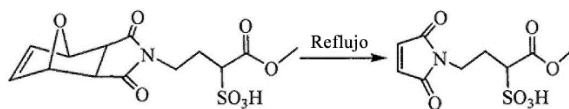
Se añadió furano (5,5 ml, 75,6 mmol) a maleimida (5,0 g, 51,5 mmol) en etiléter (200 ml). Se calentó la mezcla dentro de una bomba de autoclave de 1 l a 100 °C durante 8 h. Se enfrió la bomba a temperatura ambiente y se aclaró el sólido interior con metanol, se concentró y se cristalizó con acetato de etilo/hexano, procurando 8,4 g (99 %) del compuesto del título. RMN-1H (DMF-d₇): 11,08 (s, 1H) (NH), 6,60 (m, 2H), 5,16 (m, 2H), 2,95 (m, 2H). RMN-13C 178,84, 137,69, 82,00, 49,92. MS m/z+ 188,4 (MW + Na).

25 4-N-(3, 6-Endoxo-Δ-tetrahydroftalido)-2-sulfobutirato de metilo



Se añadieron K₂CO₃ (1,4 g, 10,13 mmol) y KI (0,19 g, 1,14 mmol) a 3,6-endoxo-Δ-tetrahydroftalida (0,80 g, 4,85 mmol) en DMA (20 ml). Después de agitar bajo Ar durante 1 h, se añadió 4-bromo-2-sulfobutirato de metilo (0,98 g, 3,77 mmol) en DMA (10 ml). Se agitó la mezcla bajo Ar, se evaporó, se redisolvió en HAc al 1 % en metanol, se filtró, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ y se eluyó con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc 1:5:0,01 a 1:4:0,01, procurando 0,98 g (75 %) del compuesto del título. RMN-1H (DMF-d₇): 6,59 (m, 2H), 5,16 (dd, 2H, J= 0,8, 7,8 Hz), 3,65-3,63 (m, 3H), 3,47 (m, 2H), 3,01 (s, 3H), 2,83 (m, 2H). RMN-13C 172,94, 162,86, 137,68, 81,98, 52,39, 49,91, 48,58, 36,01, 21,97. MS m/z- 343,9 (MW - H).

4-N-Maleimido-2-sulfobutirato de metilo



40

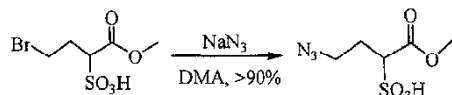
En un matraz de fondo redondo abierto, se calentó a 120~140 °C durante 4 h 4-N-(3,6-endoxo-Δ-tetrahydroftalido)-2-sulfobutirato de metilo (0,30 g, 0,87 mmol) en 20 ml de DMA/NaH₂PO₄ 100 mM 1:1, pH 7,0. Durante el tiempo de reacción, se añadieron gradualmente 5 x 10 ml de agua para mantener el volumen de reacción a alrededor de 15 ml. Se concentró la mezcla hasta sequedad y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc 1:5:0,01 a 1:4:0,01, procurando 0,230 g (95 %) del compuesto del título. RMN-1H (DMF-d₇): 6,60 (s, 2H), 4,06 (d, 1H),

45

3,60 (m, 3H), 3,47 (m, 2H), 2,43 (m, 2H); RMN-¹³C 171,59, 164,96, 136,10, 66,20, 51,71, 34,82, 22,10. MS m/z-276,6 (MW- H).

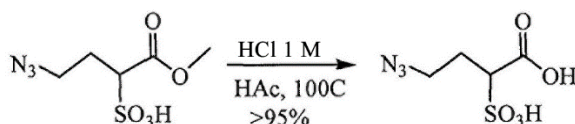
4-Azido-2-sulfobutirato de metilo

5



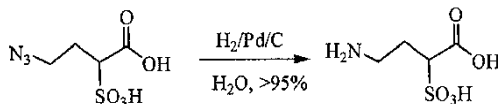
Se agitaron durante una noche 4-bromo-2-sulfobutirato de metilo (1,07 g, 4,11 mmol) y azida de sodio (0,70 g (10,7 mmol) in DMF (50 ml). Se evaporó la mezcla, se purificó por cromatografía en SiO₂, se eluyó con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc 10 1:5:0,01 y se cristalizó con CH₃OH/tolueno/hexano, procurando 1,00 g (95 %) del compuesto del título. P.f.= 267-272 °C (descomp). RMN-¹H (DMF-d₇): 12,06 (a, 1H), 3,65 (s, 3H), 359 (dd, 1H, J= 5,4, 8,9 Hz), 3,47 (m, 2H), 2,24 (m, 2H).RMN-¹³C 171,10, 64,29, 52,24, 50,64, 21,35. ESI MS m/z+ 267,9 (M + 2Na-H), m/z- 222,0 (M-H). HRMS m/z- (C₅H₉N₃O₅S-H) calc. 222,0185, encontrado 222,0179.

15 Ácido 4-azido-2-sulfobutírico



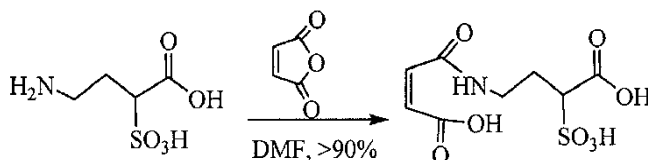
Se calentó a 100 °C durante 8 h 4-azido-2-sulfobutirato de metilo (1,00 g, 4,08 mmol) en una mezcla de HCl (50 ml, 20 1,0 M) y HAC (5 ml). Se evaporó la mezcla, se coevaporó con 3 x 50 ml de agua y se cristalizó con agua/acetona, procurando 1,0 g (99 %) del compuesto del título. RMN-¹H (DMF-d₇): 3,60 (m, 2H), 3,52 (m, 1H), 2,24 (m, 2H).RMN-¹³C 170,96, 63,04, 50,66, 29,12. ESI MS m/z- 207,7 (MW -H); HRMS m/z- (C₄H₇N₃O₅S-H) calc. 208,0028, encontrado 208,0021.

25 Ácido 4-amino-2-sulfobutírico

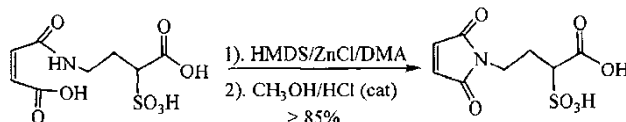


Se dispusieron ácido 4-azido-2-sulfobutírico (500 mg, 2,40 mmol), agua (20 ml) y Pd/C (110 mg, Pd al 10 %, al 50 % 30 basado en agua) en una botella agitada de hidrogenación de 250 ml. Después de extraer el aire de la botella a vacío, se pasaron 20 psi de hidrógeno a la botella. Se agitó la mezcla durante 8 h, se filtró entonces a través de Celite, se lavó con DMF, se evaporó y se coevaporó con DMF seca, procurando 476 mg (91 % de sal HCl) del producto del título. ESI MS m/z- 181,8 (MW -H). Se usó este producto directamente sin purificación adicional.

35 Ácido (Z)-4-(3-carboxi-3-sulfopropilamino)-4-oxo-2-butenico

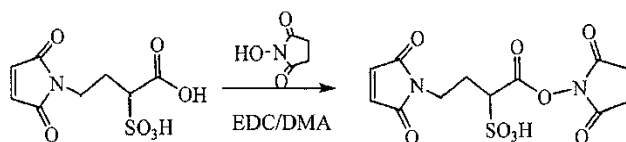


Se añadió anhídrido maleico (232 mg, 2,36 mmol) a la sal HCl del ácido 4-amino-2-sulfobutírico anterior (476 mg, 2,16 40 mmol) en DMF seca (20 ml). Se agitó la mezcla bajo Ar durante una noche, se evaporó y se purificó en una columna c-18 de φ 1,0 x 25 cm autoempaquetada eluida con agua. Se combinaron las fracciones que contenían producto, se evaporaron y se cristalizaron con H₂O/acetona, procurando 552 mg (91 %) del producto del título. RMN-¹H (DMF-d₇): 9,70 (a, 1H), 6,73 (d, 1H, J= 12,8 Hz), 6,32 (d, 1H, J= 12,8 Hz), 3,69 (m, 1H), 3,47 (m, 2H), 2,27 (m, 2H).RMN-¹³C 171,47, 167,32, 165,87, 135,44, 133,07, 63,82, 39,13, 27,62. ESI MS m/z- 279,8 (MW -H); HRMS m/z- (C₈H₁₁NO₈S-H) calc. 280,0127, encontrado 280,0121. 45 H)

Ácido 4-N-maleimido-2-sulfobutanoico

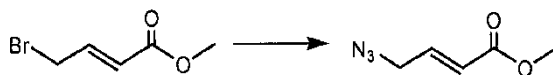
5

Se calentó ácido (Z)-4-(3-carboxy-3-sulfopropylamino)-4-oxobut-2-enoico (310 mg, 1,10 mmol) en mezcla de DMA seca (5 ml) y tolueno seco (20 ml). Después de que la temperatura alcanzara los 80 °C, se añadieron HMDS (hexametildisilazano) (1,40 ml, 6,71 mmol) y ZnCl₂ (1,85 ml, 1,0 M en dietiléter, 1,85 mmol). Se continuó calentando la mezcla a 115~125 °C y se recogió tolueno mediante una trampa de Dean-Stark. Se calentó a reflujo a 120 °C la mezcla de reacción durante 6 h. Durante este periodo, se añadieron 2 x 20 ml de tolueno seco para mantener el volumen de mezcla a alrededor de 8~10 ml. Se enfrió entonces la mezcla, se añadió 1 ml de HCl (conc.)/CH₃OH yH 1:10, se evaporó, se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (1:5:0,01 a 1:4:0,01), procurando 260 ml (92 %) del producto del título. RMN-¹H (DMF-d₇): 10,83 (a, 1H), 6,95 (s, 2H), 1H, J= 12,8 Hz), 3,65 (m, 1H), 3,54 (m, 2H), 2,27 (m, 2H). RMN-¹³C 173,61, 172,04, 135,47, 64,18, 37,1, 27,89. ESI MS m/z- 261,8 (MW - 15 H). HRMS m/z-(C₈H₉NO₇S -H) calc. 262,0021, encontrado 262,0027.

4-N-Maleimido-2-sulfobutirato de succinimidilo

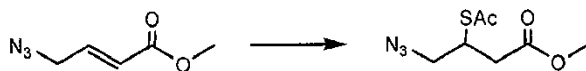
20

Se añadió ácido 4-N-maleimido-2-sulfobutanoico (260 mg, 0,99 mmol) en DMA (10 ml) a NHS (220 mg, 1,91 mmol) y EDC (500 mg, 2,60 mmol). Se agitó la mezcla bajo Ar durante una noche, se evaporó, se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₂CH₂/CH₃OH/HAC (10000:1000:1 a 10000:2000:1) y se cristalizó entonces con DMA/EtAc/hexano, procurando 285 mg (81 % de rendimiento) del compuesto del título. RMN-¹H (DMF-d₇) 6,99 (s, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,64 (m, 2H), 2,75 (s, 4H), 2,34 (m, 2H); RMN-¹³C 171,97, 171,82, 166,64, 135,58, 62,00, 36,66, 26,62; ESI MS m/z- 358,9 (M-H); HRMS m/z- (C₁₂H₁₂N₂O₉S -H) calc. 359,0185, encontrado 359,0178

(E)-4-Azidobut-2-enoato de metilo

30

Se añadió 4-bromocrotonato de metilo (5,00 ml, 85 %, 36,10 mmol) a una solución de NaN₃ (2,80 g, 43,01 mmol) en 100 ml de DMF a -20 °C. Después de agitar a -20 °C durante 30 min, se agitó la mezcla a 0 °C durante 4 h, se evaporó, se suspendió con EtAc/hexano (1:1), se filtró, se evaporó y se sometió a purificación cromatográfica en columna de SiO₂ eluida con EtAc/hexano (1:25 a 1: 10), procurando el HRMS para 4,08 g (80 %) del producto del título. RMN-¹H (CDCl₃) 6,88 (m, 1H), 6,06 (ddd, 1H, J =1,7, 3,4, 15,6 Hz), 3,97 (dd, 2H, J= 1,2, 4,96 Hz), 3,73 (s, 3H); RMN-¹³C 166,23, 140,86, 123,49, 51,95, 51,36; ESI MS m/z+ 182,5 (M+ Na + H₂O); HRMS m/z+ (C₅H₇N₃O₂+ H₂O + Na) calc. 182,0542, encontrado 182,0548.

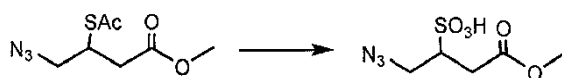
40 3-(Acetiltio)-4-azidobutanoato de metilo

Se añadió una mezcla de ácido tiolacético (3,0 ml, 42,09 mmol) y DIPEA (8,0 ml, 45,92 mmol) en 60 ml de THF durante 20 min a una solución de (E)-4-azidobut-2-enoato de metilo (4,00 g, 28,37 mmol) en 60 ml de THF a 0 °C. Después de agitar durante a 0 °C durante 1 h, se agitó la mezcla a TA durante una noche, se evaporó, se redisolvió en CH₂Cl₂, se lavó con NaHCO₃(sat.) y NaH₂PO₄ 1 M /NaCl (sat.), pH 4 respectivamente, se secó sobre MgSO₄, se filtró, se evaporó y se sometió a purificación cromatográfica en columna de SiO₂ eluida con EtAc/hexano (1:8 a 1: 4),

procurando el HRMS para 4,98 g (81 %) del producto del título. RMN-¹H (CDCl₃) 3,66 (m, 1H), 3,62 (s, 3H), 3,40 (dd, 1H, J= 7,5, 12,7 Hz), 3,31 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,32 (s, 3H); RMN-¹³C (DMF-d₇) 192,20, 172,48, 56,56, 53,60, 51,31, 34,58, 30,56; ESI MS m/z+ 240,0 (M+ Na), 255,9 (M+ K); HRMS m/z+ (C₇H₁₁N₃O₃S+ Na) calc. 240,0419, encontrado 240,0415.

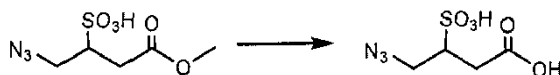
5

Ácido azido-4-metoxi-4-oxobutano-2-sulfónico



10 Se añadieron 25 ml de H₂O₂ (al 30 %) a 3-(acetiltio)-4-azidobutanoato de metilo (4,00 g, 18,43 mmol) en 75 ml de ácido acético. Se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó, se coevaporó con EtOH/tolueno y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:800:1 a 100:500:1), procurando 3,85 g (93 %) del compuesto del título. RMN-¹H (CD₃OD) 3,78 (dd, 1H, J= 5,0, 12,7 Hz), 3,62 (s, 3H), 3,44 (dd, 1H, J= 7,5, 12,7 Hz), 3,33 (m, 1H), 2,84 (dd, 1H, J= 5,6, 16,5 Hz), 2,57 (dd, 1H, J= 7,5, 16,5 Hz); RMN-¹³C (DMF-d₇) 173,37, 57,31, 52,54, 52,49, 34,51; ESI MS m/z- 221,7 (M+ H).

Ácido 4-azido-3-sulfobutanoico



20

Se añadieron 8,0 ml de HAc a ácido azido-4-metoxi-4-oxobutano-2-sulfónico (3,80 g, 17,04 mmol) en 150 ml de HCl 1,0 M. Se calentó la mezcla a reflujo a 120 °C durante una noche, se evaporó, se coevaporó con agua, EtOH y EtOH/tolueno respectivamente, y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:500:1 a 100:400:1), procurando 3,02 g (85 %) del compuesto del título. RMN-¹H (CD₃OD) 3,77 (dd, 1H, J= 5,1, 12,8 Hz), 3,45 (dd, 1H, J= 7,0, 12,8 Hz), 3,31 (m, 1H), 2,86 (dd, 1H, J= 4,7, 16,7 Hz), 2,51 (dd, 1H, J= 8,4, 16,7 Hz); RMN-¹³C (DMF-d₇) 173,98, 67,50, 59,78, 27,82; ESI MS m/z- 207,7 (M- H).

Ácido 4-amino-3-sulfobutanoico

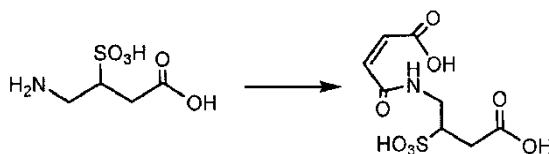


30

En una botella de hidrogenación de 500 ml, se añadieron ácido 4-azido-3-sulfobutanoico (3,00 g, 14,35 mmol), 150 ml de metanol y 0,32 g de Pd/C (Pd al 10 %, 50 % húmedo). Después de extraer el aire, se condujeron 30 psi de H₂ y se agitó la mezcla durante un anoche, se filtró a través de Celite, se evaporó y se coevaporó con EtOH seco, procurando aproximadamente 2,50 g (95 %) de ácido 4-amino-3-sulfobutanoico. RMN-¹H (CD₃OD) 3,24 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 2,90 (dd, 1H, J= 2,6, 16,5 Hz), 2,33 (dd, 1H, J= 10,1, 16,5 Hz), ESI MS m/z- 181,60 (M- H). El compuesto resultante era inestable y se usó directamente sin purificación adicional.

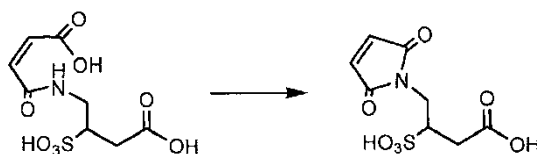
Ácido (Z)-4-(3-carboxi-2-sulfopropilamino)-4-oxobut-2-enoico

40



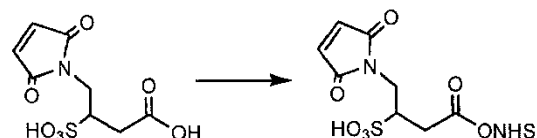
Se añadió anhídrido maleico (1,48 g, 15,10 mmol) a una solución de ácido 4-amino-3-sulfobutanoico (~2,50 g, 13,66 mmol) en 100 ml de DMA y se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó, se purificó en columna C-18 (2 x 30 cm) eluida con HAc al 1 % en agua y se cristalizó con MeOH/acetona/tolueno, procurando 3,34 g (83 %) de ácido (Z)-4-(3-carboxi-2-sulfopropilamino)-4-oxobut-2-enoico. RMN-¹H (CD₃OD) 6,33 (d, 1H, J= 12,6 Hz), 6,10 (d, 1H, J= 12,6 Hz), 3,64 (dd, 1H, J= 5,8, 14,0 Hz), 3,54 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 2,78 (dd, 1H, J= 4,9, 16,8 Hz), 2,39 (m, 1H); RMN-¹³C 173,52, 168,68, 167,98, 135,59, 127,79, 57,31, 40,56, 34,52; ESI MS m/z-279,7 (M- H).

Ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-sulfobutanoico



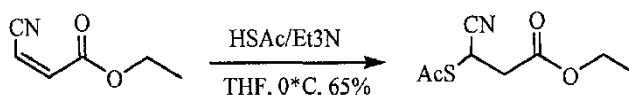
Se calentaron ácido (Z)-4-(3-carboxi-2-sulfopropilamino)-4-oxobut-2-enoico (450 mg, 1,60 mmol) en mezcla de 10 ml de DMA seca y 50 ml de tolueno seco. Después de alcanzar la temperatura de 80 °C, se añadieron HMDS (hexametildisilazina, 1,80 ml, 8,63 mmol) y ZnCl₂ (3,2 ml, 1,0 M en dietiléter). Se siguió calentando la mezcla a 115~125 °C y se recogió tolueno mediante una trampa Dean-Stark. Se calentó a reflujo a 120 °C la mezcla de reacción durante 6 h. Durante este periodo, se añadieron 2 x 20 ml de tolueno seco para mantener el volumen de mezcla a alrededor de 8~10 ml. Se enfrió entonces la mezcla, se añadió 1 ml de HCl (conc.)/CH₃OH 1:10, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc 1:5:0,01, procurando 315 mg (75 %) del producto del título. RMN-¹H (DMF-d₇) 6,96 (s, 2H), 4,04 (dd, 1H, J= 4,3, 13,8 Hz), 3,47 (m, 1H), 3,23 (dd, 1H, J= 7,4, 14,7 Hz), 2,99 (dd, 1H, J= 3,3, 16,8 Hz), 2,35 (dd, 1H, J= 8,1, 16,9 Hz); RMN-¹³C 173,58, 172,18, 135,54, 54,61, 40,24, 32,43, ESI MS m/z- 261,70 (M -H).

15 Ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-4-oxobutano-2-sulfónico



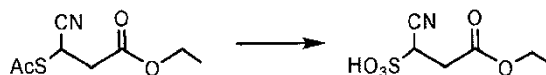
Se agitaron ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-sulfobutanoico (110 mg, 0,418 mmol), EDC (240 mg, 1,25 mmol) y N-hidroxisuccinimida (58 mg, 0,504 mmol) en 10 ml de DMA durante una noche, se evaporaron y se purificaron por cromatografía en SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HAc (100:900:1 a 100: 600:1), procurando 112 mg (75 %) del producto del título. RMN-¹H (DMF-d₇) 6,93 (s, 2H), 4,06 (dd, 1H, J= 4,8, 13,1 Hz), 3,80 (dd, 1H, J= 10,7, 13,9 Hz), 3,35 (dd, 1H J= 3,3, 17,8 Hz), 3,25 (m, 1H), 3,10 (dd, 1H, J= 2,2, 16,4 Hz), 2,87 (m, 4H); RMN-¹³C 172,27, 170,88, 169,29, 135,55, 55,28, 40,22, 32,69, 26,66; ESI MS m/z- 261,70 (M-H).

3-(Acetiltio)-3-cianopropanoato de etilo



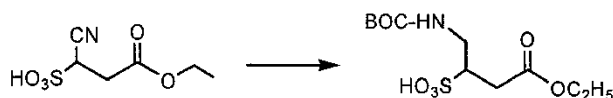
Se añadió una solución de ácido tiolacético (5,0 ml, 70,15 mmol) y DIPEA (16,0 ml, 92,03 mmol) en 20 ml de THF durante 30 min a (Z)-3-cianoacrilato de etilo (5,01 g, 40,00 mmol) en 80 ml de THF a -20 °C. Se mantuvo la reacción a -20 °C durante 4 h y entonces a temperatura ambiente durante una noche. Se concentró la mezcla, se diluyó con CH₂Cl₂ se lavó con NaHCO₃ saturado, se secó sobre MgSO₄, se filtró, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ (EtAc/hexano 1:4), procurando 5,22 g (65 %) del compuesto del título. R_f= 0,25 (EtAc/hexano 1:4); RMN-¹H (CDCl₃) 4,44 (m, 1H), 4,11 (dd, 2H, J= 7,1, 14,3 Hz), 3,38 (m, 1H), 3,15 (m, 1H), 2,17 (s, 3H), 1,19 (t, 3H, J= 7,2 Hz); RMN-¹³C 194,12, 173,21, 119,82, 61,35, 33,52, 30,08, 14,62; MS m/z+ 225,9 (MW + Na), m/z- 201,7 (MW-H).

Ácido ciano-3-etoxi-3-oxopropano-1-sulfónico



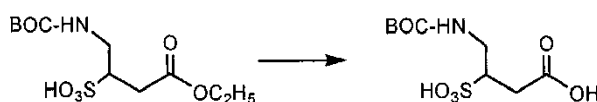
Se añadió H₂O₂ (12 ml, 30 %) a 3-(acetiltio)-3-cianopropanoato de etilo (2,00 g, 9,95 mmol) en ácido acético (40 ml). Se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó y se purificó por cromatografía en gel de sílice eluida con metanol/diclorometano/ácido acético (1:8:0,01 a 1:5:0,01), procurando 1,72 g (84 %) del compuesto del título. RMN-¹H (DMSO), 4,63 (m, 1H), 4,12 (dd, 2H, J= 7,1, 14,3 Hz), 3,27 (m, 1H), 3,05 (m, 1H), 1,28 (t, 3H, J= 7,2 Hz); RMN-¹³C 173,15, 113,85, 61,38, 48,32, 26,33, 14,15; MS m/z- 205,7 (MW-H).

Ácido 1-(terc-butoxicarbonilamino)-4-etoxi-4-oxobutano-2-sulfónico



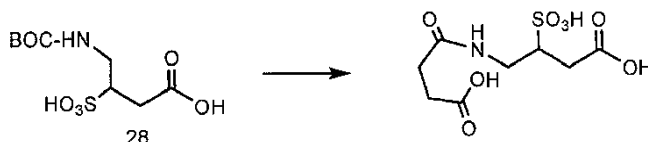
Se añadieron a una botella de hidrogenación ácido ciano-3-etoxi-3-oxopropano-1-sulfónico (2,50 g, 12,06 mmol),
 5 etanol (80 ml), níquel Raney filtrado reciente (0,40 g) y anhídrido de BOC (3,30 g, 15,12 mmol). Después de extraer el aire dentro de la botella a vacío, se condujeron 20 psi de hidrógeno a la botella. Se agitó la botella durante una noche, se filtró a través de Celite, se evaporó y se purificó por cromatografía en gel de sílice eluida con metanol/diclorometano/ácido acético (1:6:0,01), procurando 3,18 g (85 %) del compuesto del título. RMN-¹H (DMSO), 6,82 (s, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,11 (dd, 2H, J= 7,1, 14,3 Hz), 3,53 (dd, 1H, J= 4,2, 13,4 Hz), 3,36 (m, 1H), 2,86 (m, 1H),
 10 2,51 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,22 (t, 3H, J= 7,2 Hz); RMN-¹³C 173,35, 155,72, 80,44, 62,05, 52,55, 41,61, 34,50, 28,85, 14,52; MS m/z- 309,8 (MW-H).

Ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-sulfobutanoico



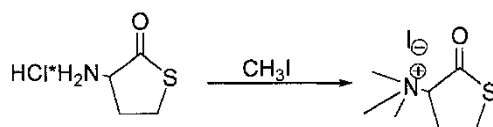
15 Se añadió hidróxido de litio monohidratado (2,0 g, 47,6 mmol) a ácido 1-(terc-butoxicarbonilamino)-4-etoxi-4-oxobutano-2-sulfónico (402 mg, 1,29 mmol) en mezcla de THF/H₂O (1:2, 60 ml). Se agitó la mezcla bajo Ar durante una noche, se concentró y se purificó en columna C-18 (2 x 30 cm) eluida con agua al 100 % a metanol al 10 % en
 20 agua, procurando 328 mg (90 %) del compuesto del título. RMN-¹H (DMSO), 6,78 (s, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,57 (dd, 1H, J= 4,2, 13,4 Hz), 3,41 (m, 1H), 2,89 (m, 1H), 2,61 (m, 1H), 1,39 (s, 9H); RMN-¹³C 174,21, 155,82, 79,85, 59,95, 42,06, 32,52, 28,88, 14,55; ESI MS 281,8 (M-H).

Ácido (Z)-4-(3-carboxi-2-sulfopropilamino)-4-oxobut-2-enoico



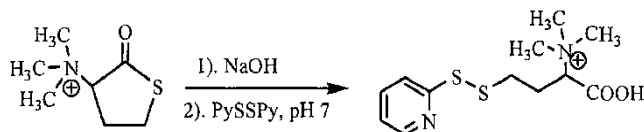
25 Se agitó ácido 4-(terc-butoxicarbonilamino)-3-sulfobutanoico (321 mg, 1,13 mmol) en una mezcla de HCl (conc)/dioxano (1:4, 15 ml) durante 30 min, se evaporó y se coevaporó con EtOH/tolueno (1:1, 4 x 20 ml) hasta
 30 sequedad. Se añadieron al material secado anhídrido maleico (121 mg, 1,23 mmol) y DMA (20 ml) y se agitó la mezcla durante una noche, se evaporó y se paso a través de una columna C-18 eluida con agua y se cristalizó con EtOH/hexano, procurando 263 mg (83 %) del compuesto del título. ESI MS 279,8 (M-H). Los datos de RMN son los mismos que por la ruta con ácido 4-azido-3-sulfobutanoico.

35 N,N,N-Trimetil-2-oxotetrahidrotiofen-3-aminio



40 Se agitaron clorhidrato de 3-aminodihidrotiofen-2(3H)-ona (6,00 g, 39,1 mmol), bicarbonato de sodio (3,28 g, 39,1 mmol) y yodometano (13 ml, 209 mmol) en metanol seco (100 ml) durante una noche, se filtraron a través de Celite, se evaporaron, se purificaron en columna de SiO₂ eluida con MeOH/CH₂Cl₂/HAc (1:5:0,01) y se cristalizaron con EtOH/hexano, procurando 5,25 g (84 %) del producto del título. Pf 228- 231 °C. RMN-¹H (CD₃OD) 4,27 (m, 1H), 3,25 (s, 9H), 2,56-2,47 (m, 2H), 2,34 (m, 1H), 2,26 (m, 1H); RMN-¹³C 168,97, 75,06, 53,25, 30,85, 16,46; ESI MS m/z+ 160,0 (M⁺).

45 1-Carboxi-N,N,N-trimetil-3-(piridin-2-ildisulfanil)propan-1-aminio



Se agitó acetato de N,N,N-trimetil-2-oxotetrahidrotiofen-3-aminio (2 g, 9,13 mmol) en 75 ml de NaOH 1 M (3 g de NaOH en 75 ml de H₂O) durante 45 min, se neutralizó con H₃PO₄ 4 M hasta pH 7,4, se concentró y se añadió a 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (11 g, 49,9 mmol) en 200 ml de MeOH. Se agitó la mezcla durante un anoche y se extrajo con EtAc. Se evaporó la solución acuosa, se suspendió en MeOH, se filtró la sal, se evaporó y se purificó en columna C-18 (2 cm x 30 cm) eluida con agua/metanol (100 % de agua a 20 % de metanol/agua), procurando 2,6 g (75 %) del producto del título. ESI MS m/z+ 309,1 (M +Na-H).

10 1. Modificación de anticuerpo con sulfoconector

Se modifica huC242 con sulfoconector a 8 mg/ml de anticuerpo, un exceso molar de 15 veces la solución madre (~30 mM en DMA) de sulfoconector. Se lleva a cabo la reacción en NaPi 100 mM, tampón pH 8,0 con DMA (5 % v/v) durante 15, 30, 120 y 200 minutos a 25 °C. Se purificó el huC242 modificado por columna G25 con NaPi 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,5, para retirar el sulfoconector en exceso.

2. Medida de Spy-NO₂ liberable y concentración de anticuerpo de huC242 modificado

Se llevaron a cabo el ensayo y la medida espectral en NaPi 100 mM, pH 7,5, a temperatura ambiente. Se calculó la relación molar de Spy-NO₂ liberado por mol de anticuerpo huC242 midiendo la A₂₈₀ de la muestra y entonces el aumento de A₃₉₄ de la muestra después de añadir DTT (50 µl de DTT 1 M/ml de muestra). Se calcula la concentración de 2-mercaptopiridina liberada por DTT usando un ε_{394 nm} de 14.205 M⁻¹cm⁻¹. La concentración de anticuerpo puede calcularse entonces usando un ε_{280 nm} de 217.560 M⁻¹cm⁻¹ después de restar la contribución de la absorbancia de Spy-NO₂ a 280 nm (A_{394 nm}post DTT x 3344/14205) de la A_{280 nm} total medida antes de la adición de DTT. Puede calcularse entonces la relación molar de Spy-NO₂. Se calcula la concentración en mg/ml (g/l) de huC242 usando un peso molecular de 147.000 g/mol.

3.Reacción de conjugación

Se hizo reaccionar el huC242 modificado con un exceso molar de 1,7 veces de DM4 (basado en la concentración madre de SH de DM4) frente a Spy-NO₂. Se lleva a cabo la reacción a 2,5 mg/ml de anticuerpo en NaPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5 y DMA (al 5 %, v/v). Después de la adición de DM4, se incubó la reacción a 25 °C durante ~20 horas. Se purificó el conjugado final por columna G25 con histidina 10 mM, glicina 130 mM, 5 % de sacarosa, pH 5,5, para retirar el fármaco DM4 en exceso.

35 4. Cálculo de la concentración de huC242 y DM4

huC242 y DM4 absorben ambos a las dos longitudes de onda usadas para medir cada componente separadamente, es decir a 280 y 252 nm. El coeficiente de extinción a 280 nm para huC242 es de 217.560 y para DM4 es de 5180 M⁻¹cm⁻¹. Las relaciones de absorbancia a 252 m/280 nm de huC242 y DM4 son 0,368 y 5,05, respectivamente. Se calcularon las concentraciones con la siguiente ecuación

$$C_D = \frac{A_{252} - 0.368A_{280}}{24692.4} \quad C_{Ab} = \frac{A_{280} - 5180C_D}{217,560}$$

45 Resultados

Tiempo de modificación	C/A	F/A	Relación de monómero	% de fármaco libre
15 min	5,0	4,1	96,7 %	N/D*
30 min	6,1	5,4	96,2 %	<1 %
120 min	6,6	6,8	95,7 %	<1 %
200 min	6,6	6,3	95,9 %	<1 %

Título del conector C242-sulfo-DM4

Exceso de conector	L:A	DM4 xs	F:A	mg/ml de Ac	µg/ml de DM4	% de monómero	% de fármaco libre
5	2,4	1,7	1,9	0,83	8,2	95	0
10	4,1	1,7	3,3	0,83	14,4	94	0
15	5,6	1,7	4,6	0,82	20,0	93	0
20	7,3	1,7	6,0	0,82	25,8	91	0
25	9,1	1,3	6,6	0,79	27,7	92	0,6
30	10,4	1,3	7,6	0,68	27,5	94	1,1
35	12,2	1,3	8,2	0,67	26,7	95	1,6

5 Protocolo de conjugación:

Se realizó la modificación a pH 8,0, tampón A y 5 % de DMA durante 90 min a temperatura ambiente, la concentración del anticuerpo es de 7 mg/ml. Se purificó el anticuerpo modificado por columna NAP usando tampón A a pH 6,5. Se realizó la conjugación en tampón A, pH 6,5, con 5-10 % de DMA a temperatura ambiente durante una noche. La relación de fármaco a conector oscilaba de 1,3 a 1,7 dependiendo del fármaco total añadido.

Ejemplo 2: Síntesis de conjugado

Se disolvió el conector SPP o SSNPP en etanol a una concentración de aproximadamente 10 mM. Se dializó el anticuerpo en tampón A (KPi 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Para la reacción de conector, el anticuerpo estaba a 8 mg/ml, y se añadieron 7 equivalentes de conector con agitación en presencia de etanol al 5 % (v/v). Se dejó proseguir la reacción a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se retiró el conector no reaccionado del anticuerpo por filtración en gel Sephadex G25 usando una columna Sephadex G25 equilibrada con tampón A a pH 6,5 o tampón fosfato de potasio 150 mM que contiene NaCl 100 mM a pH 7,4 como se indica. Para el conector SPP, se valoró la extensión de la modificación mediante la liberación de piridin-2-tiona usando DTT 50 mM y midiendo la absorbancia a 343 nm como se describe a continuación ($\epsilon_{343} = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para piridin-2-tiona libre). Para SSNPP, se valoró la modificación directamente midiendo la absorbancia a 325 nm ($\epsilon_{325} = 10.964 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el grupo 4-nitropiridil-2-ditio conectado con el anticuerpo). Para la reacción de conjugación, se disolvió el fármaco que contiene tiol (DM1 o DC4) en DMA (N, Ndimetilacetamida) a una concentración de aproximadamente 10 mM. Se añadió lentamente el fármaco (exceso molar de 0,8-1,7 veces respecto al número de moléculas de conector por anticuerpo como se indica) con agitación al anticuerpo, que estaba a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón A (pH 6,5 o pH 7,4) a una concentración final de DMA al 3 % (v/v). Se dejó proseguir la reacción a temperatura ambiente durante los tiempos indicados. Se purificó el anticuerpo conjugado con fármaco usando una columna Sephadex G25 equilibrada con tampón B (PBS, pH 6,5). Para DML, se valoró la extensión de la conjugación de fármaco con anticuerpo midiendo las A_{252} y A_{280} del conjugado como se describe a continuación. Se usó un enfoque similar para DC4 (véase a continuación).

Medida de la piridin-2-tiona liberable y de la concentración de Ac de Ac modificado con SPP.

Se calcula la relación molar de piridin-2-tiona liberada por mol de anticuerpo midiendo la A_{280} de la muestra y entonces el aumento de A_{343} de la muestra después de añadir DTT (50 µl de DTT 1 M/ml de muestra). Se calcula la concentración de piridin-2-tiona liberada por DTT usando un ϵ_{343} de $8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentración de anticuerpo puede calcularse entonces usando un ϵ_{280} de $194.712 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ después de restar la contribución de la absorbancia de piridin-2-tiona a 280 nm ($A_{343 \text{ nm post DTT}} \times 5100/8080$) de la $A_{280 \text{ nm}}$ total medida antes de la adición de DTT. Puede calcularse entonces la relación molar de piridin-2-tiona:Ac. Se calcula la concentración en mg/ml (g/l) de Ac usando un peso molecular de 147.000 g/mol.

Medida de los grupos 5-nitropiridil-2-ditio conectados con anticuerpo y de la concentración de Ac modificado por SSNPP.

Se calcula la relación molar de grupos 4-nitropiridil-2-ditio conectados por mol de anticuerpo midiendo las A_{280} y A_{325}

de la muestra sin tratamiento con DTT. Se calcula el número de grupos 4-nitropiridil-2-ditio unidos a anticuerpo usando un $\epsilon_{325\text{ nm}}$ de $10.964\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Puede calcularse entonces la concentración de anticuerpo usando un $\epsilon_{280\text{ nm}}$ de $194.712\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ después de restar la contribución de absorbancia del grupo 5-nitropiridil-2-ditio a 280 nm ($A_{325\text{ nm}} \times 3344/10964$) de la $A_{280\text{ nm}}$ total medida. Puede calcularse entonces la relación molar de grupos 4-nitropiridil-2-ditio:Ac. Se calcula la concentración en mg/ml (g/l) de Ac usando un peso molecular de 147.000 g/mol .

Calculandolas concentraciones del componente Ac y DM1 de Ac-DM1.

Ac y DM1 absorben ambos a las dos longitudes de onda usadas para medir cada componente separadamente, es decir 280 y 252 nm . Se cuantifican los componentes usando las siguientes expresiones algebraicas que dan cuenta de la contribución de cada componente a cada longitud de onda (C_{Ac} es la concentración molar de Ac y C_D es la concentración molar de DM1):

1. $A_{280\text{ total}} = 194.712C_{Ac} + 5.700C_D$
2. $A_{252\text{ total}} = (194.712 \times 0,37)C_{Ac} + (4,7 \times 5.700)C_D$

Se resuelve cada ecuación para C_{Ac} :

$$1a) \quad C_{Ac} = \frac{A_{280} - 5.700C_D}{194,712}$$

$$2a) \quad C_{Ac} = \frac{A_{252} - 26,790C_D}{72,043}$$

y se establece una igualdad (ecuación 1a= ecuación 2a) y se resuelve para C_D :

$$C_D = \frac{A_{252} - 0.37A_{280}}{24,681}$$

Una vez se calcula la C_D , se usa el valor para resolver la C_{Ac} en la ecuación 1a (o 2a) anterior. Puede calcularse entonces la relación de DM1:Ac. Se calcula la concentración en mg/ml (g/l) de anticuerpo usando un peso molecular de 147.000 g/mol y se calcula la concentración de DM1 usando un peso molecular de $736,5\text{ g/mol}$ (DM1 conectado).

Se aumenta la eficiencia del intercambio de disulfuro con SSNPP.

Como se muestra en la Tabla 1, se mejora la eficiencia de conjugación en reacciones donde se usa SSNPP como reticulante en comparación con reacciones que usan SPP. Se calculó la eficiencia porcentual dividiendo el valor para DM1 por anticuerpo entre la relación de conector por anticuerpo por 100. Las conjugaciones del anticuerpo N901 usando SSNPP daban como resultado eficiencias de reticulación del 93 % tanto a pH 6,5 como 7,4. La eficiencia de conjugación de N901 con SPP en estos experimentos era del 70 % a pH 6,5 y del 77% a pH 7,4. La eficiencia aumentada con SSNPP demuestra que puede conseguirse una relación de DM1 a anticuerpo diana usando anticuerpo que se modifica con un número reducido de moléculas conectoras. De hecho, se consiguió una relación similar de fármaco a anticuerpo (4,3) en el conjugado final con una preparación de anticuerpo que tenía 4,2 grupos (5-nitropiridil-2-ditio) por anticuerpo introducido con SSNPP, en comparación con un anticuerpo que tiene 5,6 grupos piridil-2-ditio introducidos con SPP (Tabla 2). La cantidad de fármaco requerida para obtener resultados de conjugación comparables era por tanto un 25 % menor para el anticuerpo modificado con SSNPP que para el anticuerpo modificado con SPP en estas condiciones. Un beneficio potencial adicional de la eficiencia aumentada con SSNPP es que puede usarse un exceso molar reducido de DM1 en la reacción de conjugación. Una comparación de las relaciones de DM1 por anticuerpo después de conjugación con un intervalo de equivalentes de fármaco en la reacción (exceso de 0,8-1,7 veces) muestra que es suficiente un exceso molar de 1,1 veces para conseguir una eficiencia de conjugación del 100 % usando el reticulante SSNPP (Figura 7). Se muestra una comparación del curso temporal de la reacción de DM1 con anticuerpo que se había modificado con SSNPP o SPP, por ejemplo, en la Figura 8. En cada caso, se trató el anticuerpo modificado con un exceso molar de 1,1 veces de DM1 por mol de conector incorporado. La reacción con el anticuerpo modificado con SSNPP es considerablemente más rápida que con el anticuerpo modificado con SPP (Figura 8). Es más, un exceso molar de 1,7 veces no es suficiente para conseguir una eficiencia similar usando SPP. La capacidad de usar 1) un exceso molar menor de DM1 y 2) menos conectores por anticuerpo permite una reducción de la cantidad de fármaco necesaria para conseguir una relación de DM1 a anticuerpo diana de tanto como un 50 % cuando se usa SSNPP como reticulante en lugar de SPP.

Se logra una eficiencia de conjugación aumentada usando el conector SSNPP sin compromiso del carácter monomérico del conjugado ni de la cantidad de fármaco no conjugado/libre asociada con el conjugado de anticuerpo. Se usa el análisis de SEC para determinar la cantidad de monómero, dímero, trímero o agregados de mayor peso molecular. Se obtuvieron resultados típicos mayores del 90 % con cualquier conector como se muestra en la Tabla 1. Se midió el nivel de fármaco no conjugado por análisis de HPLC en fase inversa de la muestra de conjugado. El porcentaje de fármaco libre para cualquier reacción era menor del 2 %. Además, son posibles tiempos de reacción de conjugación más cortos con SSNPP en comparación con SPP (patente de EE.UU. nº 6.913.748), que pueden disminuir la pérdida de algunos anticuerpos que son sensibles a una exposición prolongada a disolvente orgánico requerida en la reacción de conjugación. Los tiempos de reacción más cortos deberían disminuir también la pérdida de fármaco debido a la dimerización de DM1, que es una reacción secundaria competitiva durante la conjugación. Los aumentos resultantes de rendimiento y reacciones secundarias reducidas deberían contribuir además a los requisitos de DM1 reducidos.

La tasa y eficiencia de conjugación mejoradas cuando se usa SSNPP se observaron también cuando se conjugaba un fármaco diferente con el anticuerpo, demostrando la amplia aplicabilidad de este nuevo reactivo conector. Se muestra una comparación de las eficiencias de conjugación usando SSNPP y SPP cuando se conjugaba el anticuerpo N901 con el fármaco alquilante de ADN DC4, un análogo de CC-1065, por ejemplo en la Tabla 3. Al cabo de 2 horas, la reacción que usa el reactivo reticulante SSNPP estaba completada, mientras que la reacción que usa el reactivo SPP mostraba solo un 73 % de completitud al cabo de 2 horas y una incorporación significativa de fármaco más allá de las 2 horas (91 % después de 18 horas). Solo tiempos de reacción muy prolongados pueden conducir a un 100 % de completitud.

Ejemplo 3. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de conjugados de maitansinoides de anticuerpos con tioéter (no escindibles) y conectores disulfuro que contienen un grupo sulfonato:

Se evaluaron típicamente los efectos citotóxicos de conjugados de anticuerpo-maitansinoide con tioéter y conectores disulfuro que contienen un grupo sulfonato usando un ensayo de viabilidad celular WST-8 después de una incubación continua de 4-5 días de las células cancerosas con los conjugados. Se incubaron células cancerosas que expresan antígeno (~1000-5000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento habitual que contiene suero fetal bovino con diversas concentraciones de conjugados de anticuerpo-maitansinoide durante aproximadamente 5 días. Se añadió entonces el reactivo WST-8 y se midió la absorbancia de placa a 450 nm después de ~2-5 h. Se representó la fracción de supervivencia frente a la concentración de conjugado para determinar el valor de C_{50} (concentración de 50 % de muerte celular) del conjugado.

Las Figuras 60 y 61 muestran la mejora de las citotoxicidades de conjugados de anti-CanAg (huC242)-maitansinoide con el conector unido por disulfuro que contiene sulfonato (huC242-Sulfo-SPDB-DM4) portador de 6,0 a 7,6 maitansinoides/Ac en comparación con el conjugado con 3,3 maitansinoides/Ac frente a células COLO205 y COLO205-MDR positivas de CanAg. La potencia de los conjugados con altas cargas de maitansinoides indica que la decoración del anticuerpo con hasta 8 moléculas de maitansinoide no afectaba a la unión del conjugado a las células COLO205 diana.

La Figura 64 muestra las actividades citotóxicas de conjugados de Ac anti-CanAg-maitansinoide con carga de maitansinoides similar frente a células COLO205-MDR positivas de antígeno CanAg. La presencia del grupo sulfonato en el conector disulfuro mejoraba significativamente la potencia del conjugado frente a estas células multifarmacorresistentes. La potencia mejorada del conjugado conectado con sulfonato es un hallazgo novedoso y potencialmente muy prometedor para aplicaciones terapéuticas.

La Figura 63 muestra las actividades citotóxicas de conjugados de Ac anti-EpCAM-maitansinoide con carga de maitansinoides similar frente a células COLO205-MDR positivas de antígeno EpCAM. La presencia de un grupo sulfonato en el conector disulfuro mejoraba significativamente la potencia del conjugado frente a estas células multifarmacorresistentes. La potencia mejorada del conjugado conectado con sulfonato es un hallazgo novedoso y potencialmente muy prometedor para aplicaciones terapéuticas.

La Figura 64 muestra las actividades citotóxicas de conjugados de Ac anti-EpCAM-maitansinoide con carga de maitansinoides similar frente a células HCT positivas de antígeno EpCAM. La presencia de un grupo sulfonato en el conector disulfuro mejoraba significativamente la potencia del conjugado frente a estas células multifarmacorresistentes. La potencia mejorada del conjugado conectado con sulfonato es un hallazgo novedoso y potencialmente muy prometedor para aplicaciones terapéuticas.

La Figura 65 muestra las actividades citotóxicas de conjugados de Ac anti-EpCAM-maitansinoide con carga de maitansinoides similar frente a células COLO205-MDR positivas de antígeno EpCAM. La presencia de un grupo sulfonato en el conector tioéter mejoraba significativamente la potencia del conjugado frente a estas células

multifarmacorresistentes. La potencia mejorada del conjugado conectado con sulfonato es un hallazgo novedoso y potencialmente muy prometedor para aplicaciones terapéuticas.

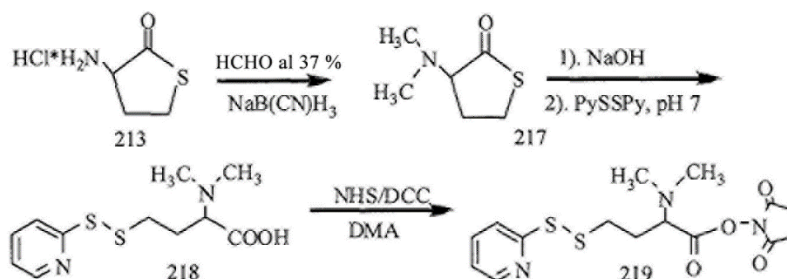
Ejemplo 4. Comparación de la actividad antitumoral in vivo de conjugados de anti-EpCAM-maitansinoide, B38.1-SPDB-DM4 y B38.1-sulfo-SPDB-DM4 sobre los xenoinjertos de cáncer de colon COLO205 y COLO205-MDR.

Se evaluó el efecto antitumoral de los conjugados B38.1-SPDB-DM4 y B38.1-sulfo-SPDB-DM4 en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de colon humano, COLO205 y COLO205-MDR, que se genomanipularon para sobreexpresar glicoproteína P. Se inyectaron las células por vía subcutánea en el área bajo el hombro derecho de ratones SCID. Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente los 200 mm³ de tamaño, se aleatorizaron los ratones por volumen tumoral y se dividieron en 3 grupos. Se trató cada grupo con un bolo i.v. sencillo de cualquiera de B38.1-SPDB-DM4 (10 mg de proteína de conjugado/kg), B38.1-sulfo-SPDB-DM4 (10 mg de proteína de conjugado/kg) o solución salina tamponada con fosfato (control de vehículo). Se monitorizó el crecimiento tumoral midiendo el tamaño de tumor dos veces por semana. Se calculó el tamaño tumoral con la fórmula: longitud x anchura x altura x ¹/₂.

Se muestran los cambios en los volúmenes de tumores de COLO205-MDR individuales en la Figura 66. El tratamiento con cualquier conjugado daba como resultado un retardo de crecimiento tumoral significativo. B38.1-sulfo-SPDB-DM4 era mas eficaz que B38.1-sulfo-SPDB-DM4 en este modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano.

Se muestran los cambios de volúmenes de tumores de COLO205 individuales en la Figura 67. El tratamiento con cualquier conjugado daba como resultado un retardo de crecimiento tumoral significativo. Dos de los seis animales tratados con B38.1-sulfo-SPDB-DM4 tenían regresiones tumores completas. Por tanto, B38.1-sulfo-SPDB-DM4 era significativamente más eficaz que B38.1-sulfo-SPDB-DM4 en este modelo.

Ejemplo 5. Síntesis de conector cargado positivamente



3-(Dimetilamino)dihidrotiofen-2(3H)-ona (217).

Se añadió cianoborohidruro de sodio (0,409 g, 6,51 mmol) en 5 porciones durante 1 h a clorhidrato de 3-aminodihidrotiofen-2(3H)-ona (213) (1,0 g, 6,51 mmol) y formaldehído (3 ml, 40,3 mmol) en metanol. Después de agitar durante 2 h, se evaporó la mezcla, se redisolvió en EtAc, se lavó con NaH₂PO₄ 1 M, se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró y se purificó por columna de SiO₂ eluida con MeOH/DCM (1:30), procurando 0,812 g (86 %) del compuesto del título. RMN-1H (CDCl₃) 3,49 (dd, 1H, J= 6,3, 12,1 Hz), 3,24 (m, 2H), 2,42 (s, 6H), 2,38 (m, 1H), 2,21 (m, 1H); RMN-13C 206,58, 73,24, 41,62, 27,47, 25,51; ESI MS m/z+146,0 (M +H), 168,0 (M +Na).

Ácido 2-(dimetilamino)-4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoico (218).

Se agitó 3-(dimetilamino)dihidrotiofen-2(3H)-ona (217) (0,95 g, 6,54 mmol) en 15 ml de NaOH 0,5 M y 10 ml de solución metanólica durante 30 min, se neutralizó con H₃PO₄ a pH 7,2 y se añadió 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (5,76 g, 26,2 mmol) en 50 ml de metanol. Se agitó la mezcla durante una noche, se concentró, se lavó con EtAc y se cargó la solución acuosa en columna C-18 eluida con metanol al 5 % con 0,01 % de ácido fórmico a metanol al 30 % con 0,01 % de ácido fórmico, procurando el producto del título (368 mg, 20,65 % de rendimiento). RMN-1H (CDI₃OD) 8,31 (dd, 1H, J= 0,7, 4,7 Hz), 7,77 (m, 2H), 7,15 (dd, 1H, J= 0,8, 5,8 Hz), 3,22 (m, 1H), 2,85 (m, 2H), 2,51 (s, 6H), 2,05 (m, 2H); RMN-13C 175,00, 161,28, 150,46, 139,40, 122,60, 121,49, 71,20, 42,46, 36,29, 29,88; ESI MS m/z+ 272,9 (M + H), 295,0 (M+Na).

2-(Dimetilamino)-4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (219)

Se agitaron ácido 2-(dimetilamino)-4-(piridin-2-ildisulfanil)butanoico (218) (92 mg, 0,338 mmol), 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (65 mg, 0,565 mmol) y EDC (185 mg, 0,965 mmol) en 3 ml de DMA a 50 °C durante una noche. Se evaporó la mezcla y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con metanol/CH₂Cl₂ 1:10 a 1:4, procurando 43 mg (35 %) del producto del título. RMN-¹H (CDCl₃OD) 8,40 (m, 1H), 7,83 (m, 2H), 7,22 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 2,82 (m, 2H), 2,75 (s, 4H), 2,66 (s, 6H), 1,98 (m, 2H); RMN-¹³C 177,21, 161,78, 161,12, 150,68, 139,37, 122,70, 121,66, 70,80, 44,16, 43,15, 36,06, 27,38; ESI MS m/z+ 369,2 (M + H).

10 Ejemplo 6. Farmacocinética in vivo:

Se analizó la farmacocinética plasmática de conjugados de conector Sulfo-Mal cargados de un anticuerpo humanizado C242 con DM4 marcado con ³H (3,5 y 6,4 DM4/Ac) en ratones CD-1 por ELISA de anticuerpo y por recuento de ³H (Figura 72). Se dosificaron los conectores Ac-Sulfo-Mal-[³H]-DM4 portadores de 3,5 y 6,4 F/A i.v. a 12,9 y 7,9 mg/kg (dosis de anticuerpo) respectivamente. Se midieron los valores de anticuerpo de muestras plasmáticas por ELISA (basado en la captura usando anticuerpo de cabra anti-huIgG y la detección usando conjugado de anticuerpo de burro anti-huIgG-peroxidasa de rábano picante) y por recuento de ³H (recuento de centelleo). La Figura 72A muestra que estas dos medidas de concentraciones de conjugado por ELISA y por recuento de ³H mostraban valores similares para cada conjugado. Ambos conjugados de anticuerpo-Sulfo-Mal-DM4 3,5 y 6,4 F/A mostraban buena estabilidad plasmática durante 4 semanas con una semivida de aproximadamente 14,9 días y 9,7 días, respectivamente, que son similares a la semivida de aproximadamente 11,8 días del anticuerpo no conjugado. La relación de DM4/Ac de los dos conjugados de Ac-Sulfo-Mal-DM4 (inicialmente 3,5 y 6,4 F/A) era también estable durante 4 semanas en circulación plasmática, de forma importante incluso a la carga relativamente alta de 6,4 F/A (Figura 72 B). La semivida del conjugado de Ac huC242-conectado con Sulfo-Mal y Sulfo-Mal-DM4 con carga de 3,5 F/A dosificado a 12,9 mg/kg era de 14,9 días (AUC= 38449 h.µg/ml), en comparación con una semivida de 12,6 días (AUC= 25910 h.µg/ml) para conjugado de Ac huC242 conectado con SMCC y SMCC-DM1 con una carga similar de 4,2 F/A dosificado a 12 mg/kg, y por tanto estaba muy mejorada frente a la del conjugado de SMCC (Figura 38 B).

Tabla 1 Comparación del conector SSNPP y SPP en la conjugación del anticuerpo N901 con DM1. Se realizó la conjugación durante 2 horas al pH indicado usando un exceso molar de 1,7 veces de DM por conector.

					%	Análisis de SEC			
Conector	pH	Conector/Ac	DM1/Ac	% de eficiencia	Fármaco libre	Monómero	Dímero	Trímero	HMW
SSNPP	7,4	4,1	3,8	93	0,8	91,9	6,3	0,6	0,1
SPP	7,4	5,6	4,3	77	1,8	93,6	4,9	0,4	0,2
SSNPP	6,5	4,0	3,7	93	0,9	-	-	-	-
SPP	6,5	6,6	4,6	70	1,9	-	-	-	-

Tabla 2 Relación de conector a anticuerpo reducida requerida para alcanzar la relación de DM1 a anticuerpo diana con SSNPP como conector. Se realizó la conjugación durante 2 horas a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,1 veces de DM1 por conector.

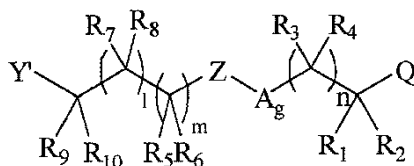
Conector	Conector/Ac	DM1/Ac
SSNPP	4,2	4,3
SPP	5,6	4,3

Tabla 3 Comparación del conector SSNPP y SPP en la conjugación de anticuerpo N901 con DC4. Se realizó la conjugación durante el tiempo indicado a pH 7,4 usando un exceso molar de 1,4 veces de DC4 por conector.

Conector	Tiempo, h	Conector/Ac	DC4/Ac	% de eficiencia
SSNPP	2	4,2	4,3	102
SSNPP	18	4,2	4,1	98
SPP	2	5,6	4,1	73
SPP	18	5,6	5,1	91

REIVINDICACIONES

1. Un reticulante para elaborar un conjugado de agente de unión celular-fármaco, donde el reticulante se representa por la fórmula (I)

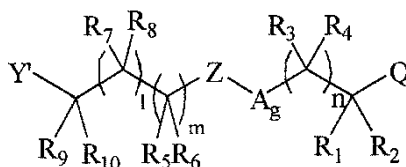


(I)

donde:

- 10 Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular seleccionado de entre un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana, donde Y' se selecciona de entre un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo, maleimida, halogenoacetato o cloruro de ácido carboxílico;
- 15 Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona de entre el grupo consistente en tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo;
- 20 uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0; n es 1, donde: R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono; y Z está ausente.

- 25 2. Uso de un reticulante para elaborar el compuesto de la reivindicación 6, donde el reticulante se representa por la fórmula (I)



(I)

donde:

- 30 Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular seleccionado de entre un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana, donde Y' es un grupo reactivo amina o un grupo reactivo tior;
- 35 Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona de entre el grupo consistente en tior, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo;
- 40 uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0; n es 1, donde: R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa fenilo o un alquilo lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono; y

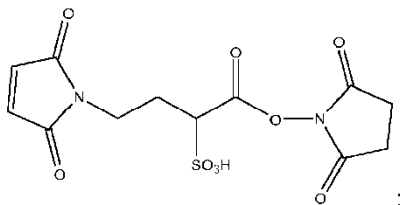
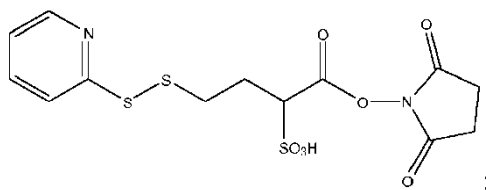
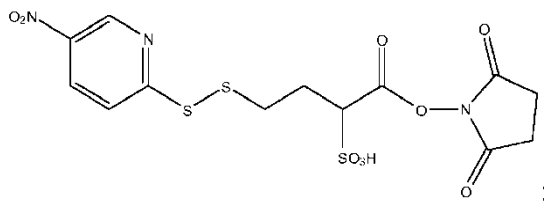
Z está ausente.

3. El uso de la reivindicación 2, donde Y' se selecciona de entre un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de pentafluorfenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo, 5 maleimida, halogenoacetato o cloruro de ácido carboxílico.

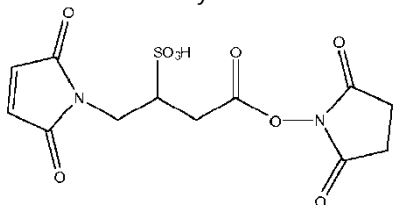
4. El reticulante de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, donde:

1. Q es un grupo disulfuro, maleimido, halogenoacetilo o éster de N-hidroxisuccinimida e Y' es un grupo disulfuro, maleimido, halogenoacetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida; o
2. uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es SO₃⁻ o X-SO₃⁻; Q es un grupo disulfuro, maleimido o halogenoacetilo e Y' es un grupo maleimido o un éster de N-hidroxisuccinimida; o
3. uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es SO₃⁻ o X-SO₃⁻; Q es un grupo piridilditio, nitropiridilditio, maleimido o halogenoacetilo e Y' es un éster de N-hidroxisuccinimida.

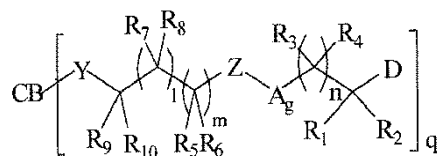
5. El reticulante de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, donde el reticulante se representa por una de las siguientes fórmulas:



y



6. Un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de entre el grupo consistente en:



(II)

donde:

CB representa un agente de unión celular, donde el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1; donde:

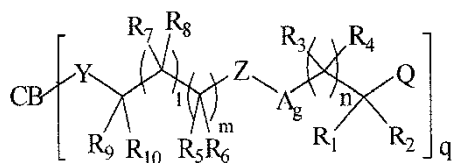
R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal de 1 a 6 átomos de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

Z está ausente;

Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y

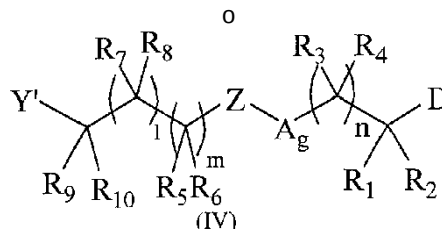
q representa un entero de 1 a 20.

7. Un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de entre el grupo consistente en:



(III)

;



(IV)

donde:

CB representa un agente de unión celular, donde el agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se una a la célula diana;

D representa un fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éter, éster, carbamato o amida;

Y' representa un grupo funcional que posibilita la reacción con un agente de unión celular, donde Y' se selecciona de entre un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de p-nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, disulfuro de piridilo, disulfuro de nitropiridilo, maleimida, halogenoacetato o cloruro de ácido carboxílico;

Q representa un grupo funcional que posibilita la conexión de un fármaco citotóxico a través de un enlace disulfuro, tioéter, tioéster, peptídico, hidrazona, éster, éter, carbamato o amida, donde Q se selecciona del grupo consistente en tiol, disulfuro, amino, carboxi, aldehído, maleimido, halogenoacetilo, hidrazina e hidroxilo; uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₉ y R₁₀ es un sustituyente cargado seleccionado de entre SO₃⁻, X-SO₃⁻, OPO₃²⁻, X-OPO₃²⁻, N⁺R₁₁R₁₂R₁₃ y X-N⁺R₁₁R₁₂R₁₃, y el resto son H; l, g y m son cada uno 0 y n es 1; donde:

R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son iguales o diferentes y son alquilo lineal que tiene 1 a 6 átomos de carbono, alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, y X representa un fenilo o un alquilo lineal de 1 a 6 átomos

de carbono, o un alquilo ramificado o cíclico que tiene de 3 a 6 átomos de carbono;

Z está ausente;

Y representa un grupo carbonilo, tioéter, amida, disulfuro o hidrazona; y

q representa un entero de 1 a 20.

5

8. El compuesto de la reivindicación 7, donde:

1. para el compuesto de fórmula (IV), uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es SO_3^- o $X-SO_3^-$; e Y' es un resto maleimido o un éster de N-hidroxisuccinimida; o

10

2. para el compuesto de fórmula (IV), Y' es un grupo disulfuro, maleimido, halogenoacetilo o un éster de N-hidroxisuccinimida; o

3. para el compuesto de fórmula (IV), uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es SO_3^- o $X-SO_3^-$; e Y' es un éster de N-hidroxisuccinimida; o

4. para el compuesto de fórmula (III), uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es SO_3^- o $X-SO_3^-$; Q es a un resto disulfuro, maleimido o halogenoacetilo e Y es tioéter, amida o disulfuro; o

15

5. para el compuesto de fórmula (III), uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es SO_3^- o $X-SO_3^-$; Q es un grupo piridilditio o nitropiridilditio e Y es un tioéter, amida o disulfuro.

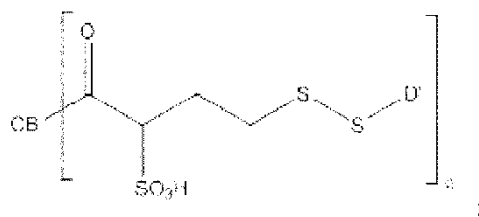
9. El compuesto de la reivindicación 6, donde el fármaco se selecciona de maitansinoides, análogos de CC-1065, morfolinodoxorubicina, taxanos, calicheamicinas, auristatinas, dímero de pirrolobenzodiacepina, siARN o una combinación de los mismos y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20

10. El compuesto de la reivindicación 6, donde uno de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_9 y R_{10} es SO_3^- o $X-SO_3^-$ y el fármaco es un maitansinoide, análogo de CC-1065 o dímero de pirrolobenzodiacepina conectado a través de un enlace disulfuro, tioéter o tioéter.

25

11. El compuesto de la reivindicación 10, donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula:



30

donde $D'-S-S$ representa el fármaco conectado con el agente de unión celular por un enlace disulfuro.

12. El compuesto de la reivindicación 11, donde el fármaco es un maitansinoide.

35

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 9-12, donde el anticuerpo, anticuerpo moncatenario o fragmento se une a células diana seleccionadas de entre células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunitarias, células activadas, células mieloides, linfocitos T activados, linfocitos B o melanocitos, células que expresan uno o mas de IGF-IR, CanAg, EGFR, receptor EphA2, MUC1, MUC 16, VEGF, TF, EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD11a, CD18, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, receptores EphA, receptores EphB, EGFR, EGFRvIII, HER2/neu, HER3, mesotelina, cripto, integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_v\beta_5$, integrina $\alpha_v\beta_6$, Apo2 y antígenos C242; y células que expresan receptor de factor de crecimiento de insulina, receptor de factor de crecimiento epidérmico o receptor de folato y, opcionalmente, donde las células tumorales se seleccionan de entre células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer de ovario, células de cáncer colorrectal, células de cáncer gástrico, células de carcinoma espinocelular, células de carcinoma pulmonar microcítico y células de cáncer testicular.

45

14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 9-13, donde el anticuerpo, anticuerpo moncatenario o fragmento se selecciona de entre el grupo consistente en:

50

(i) un anticuerpo remodelado, un anticuerpo moncatenario remodelado o un fragmento de anticuerpo remodelado del mismo; o

(ii) un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal moncatenario o un fragmento de anticuerpo monoclonal del mismo; o

- (iii) un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo remodelado, un anticuerpo monocatenario humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado del mismo; o
- (iv) un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico; o
- (v) un anticuerpo de dominio, o un fragmento de anticuerpo de dominio del mismo.

5

15. El compuesto de la reivindicación 14, donde el anticuerpo es My9-6, B4, C242, N901, DS6, CNTO 95, B-B4, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, pertuzumab o rituximab.

16. El compuesto que tiene la fórmula (II) de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 9-15 para uso en el
10 tratamiento de un tumor en un sujeto necesitado de tratamiento.

17. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del compuesto que tiene la fórmula
15 (II) de una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 9-15, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

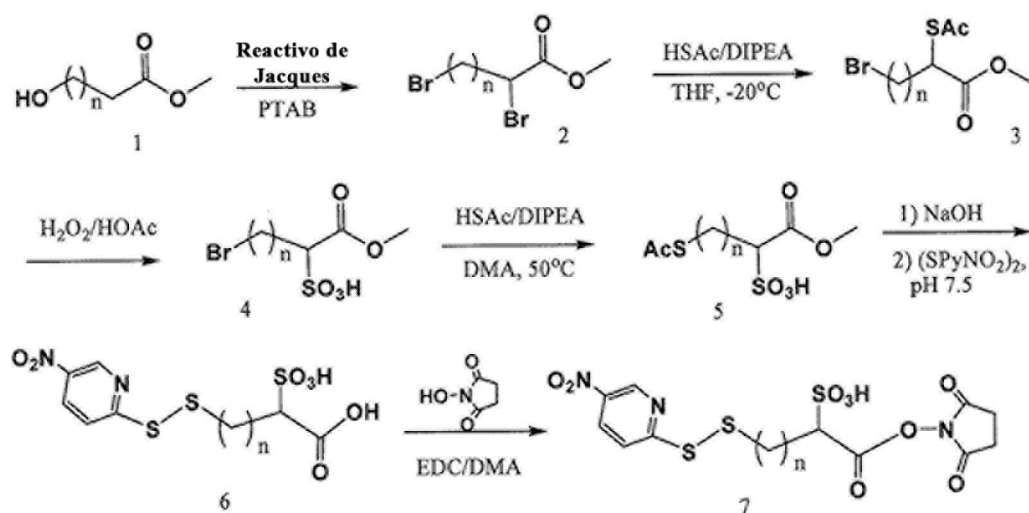
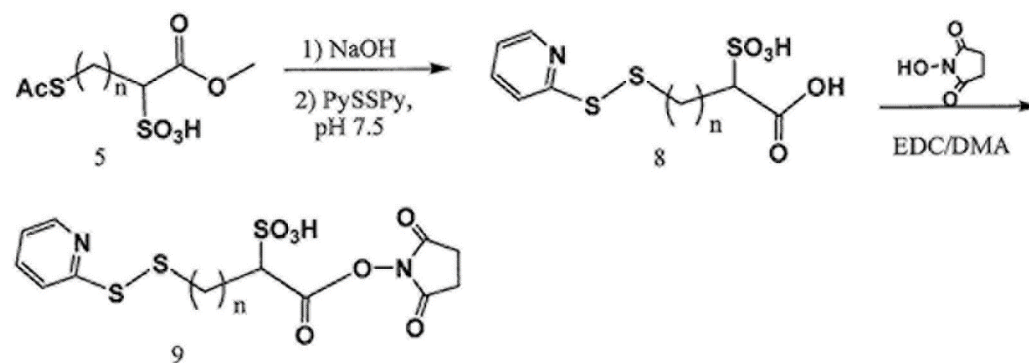
Figura 1**Figura 2**

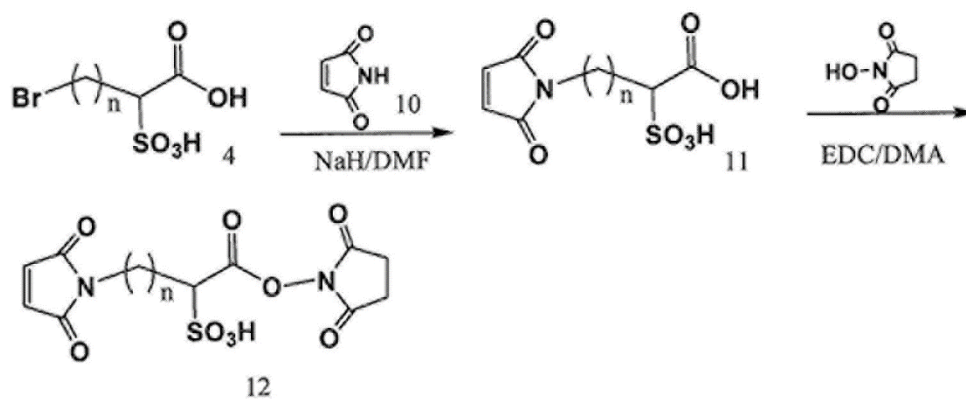
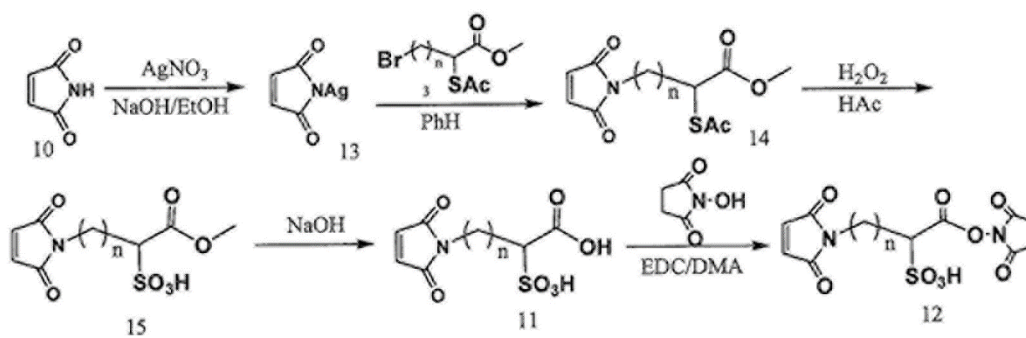
Figura 3**Figura 4**

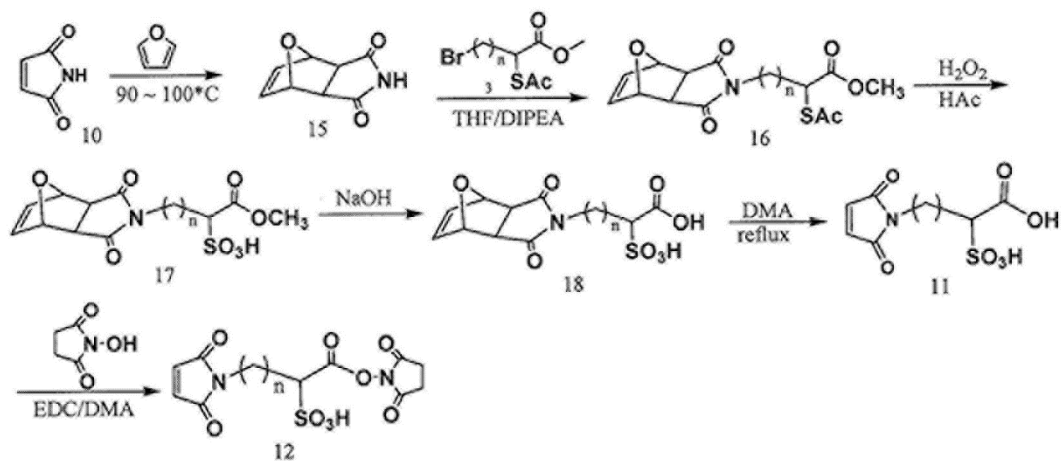
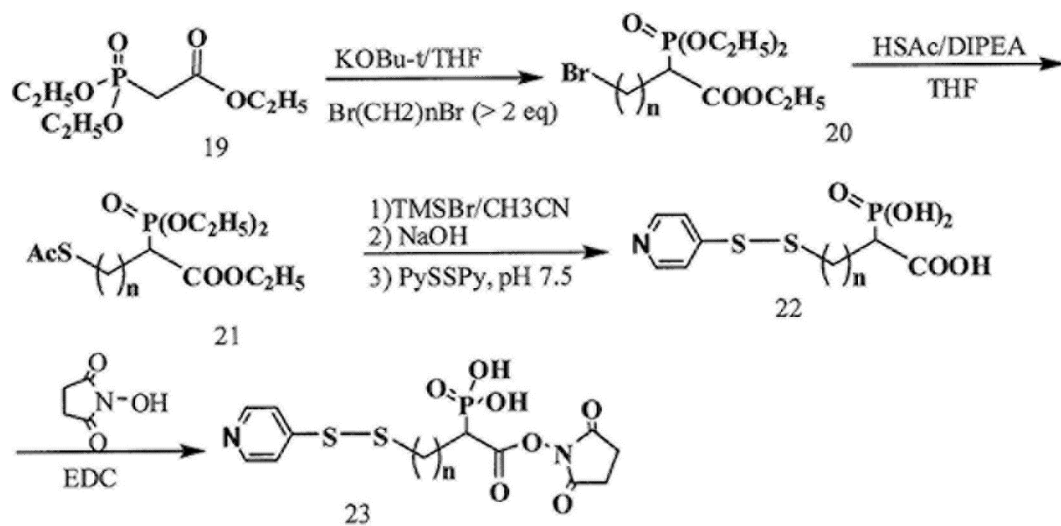
Figura 5**Figura 6**

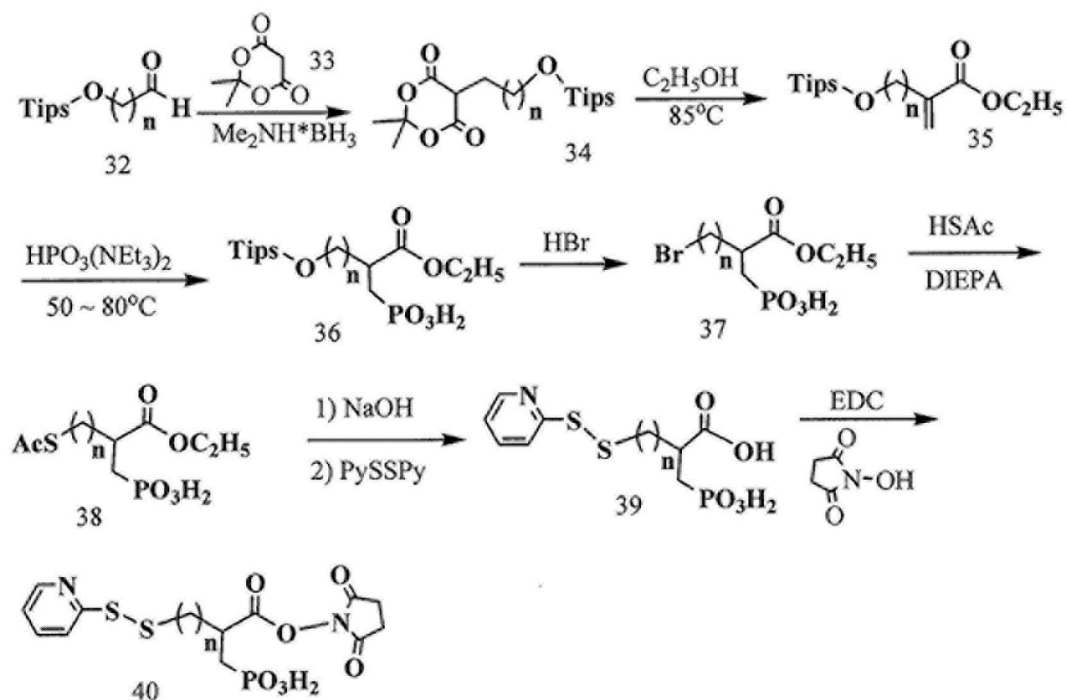
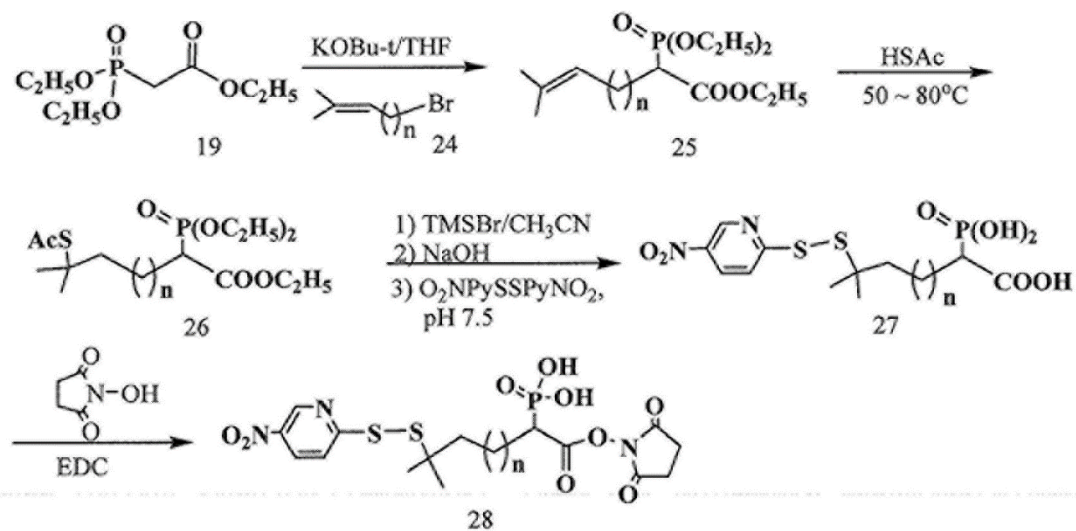
Figure 7.**Figure 8.**

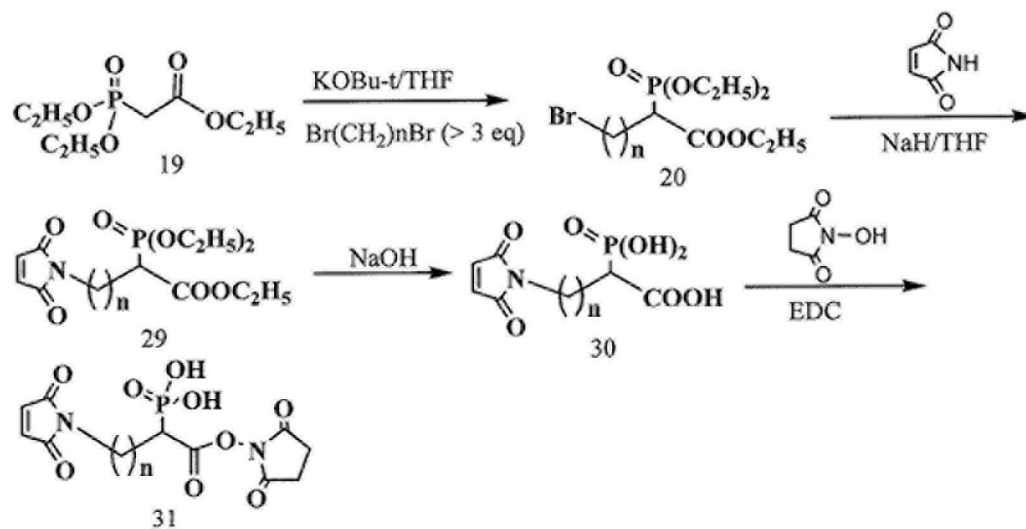
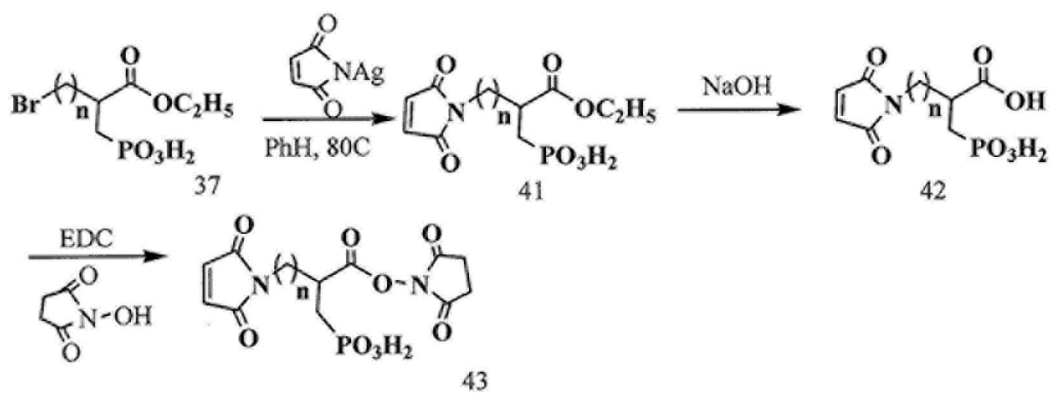
Figura 9**Figura 10**

Figura 11

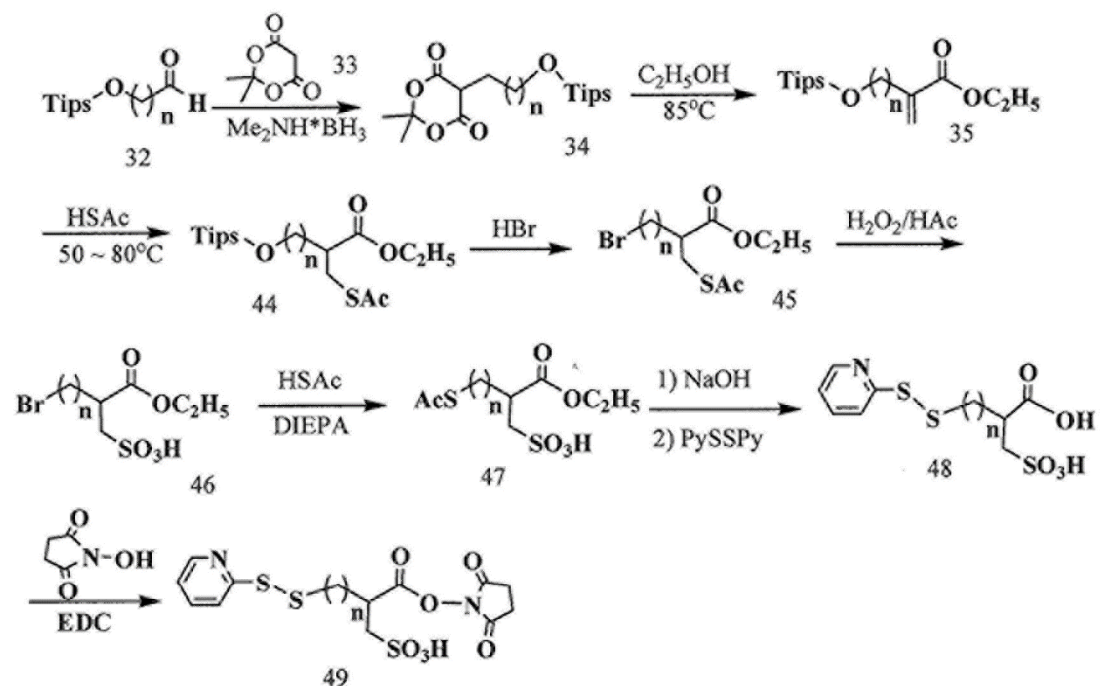


Figura 12

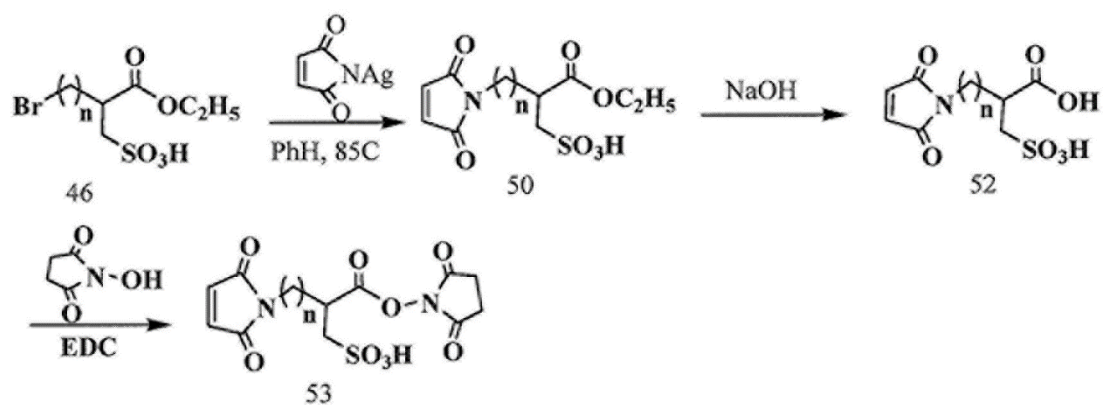


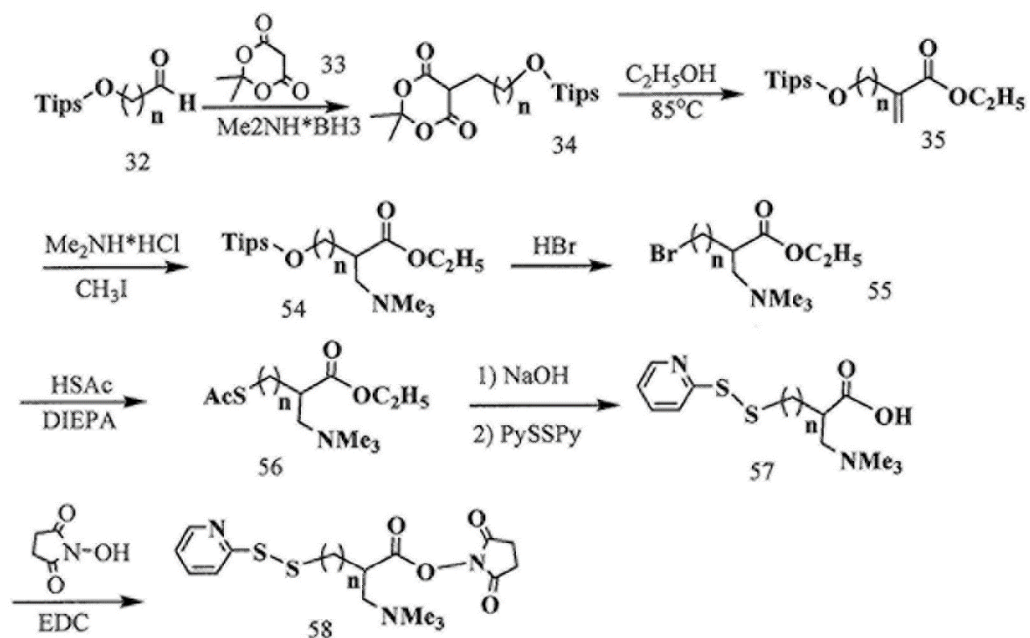
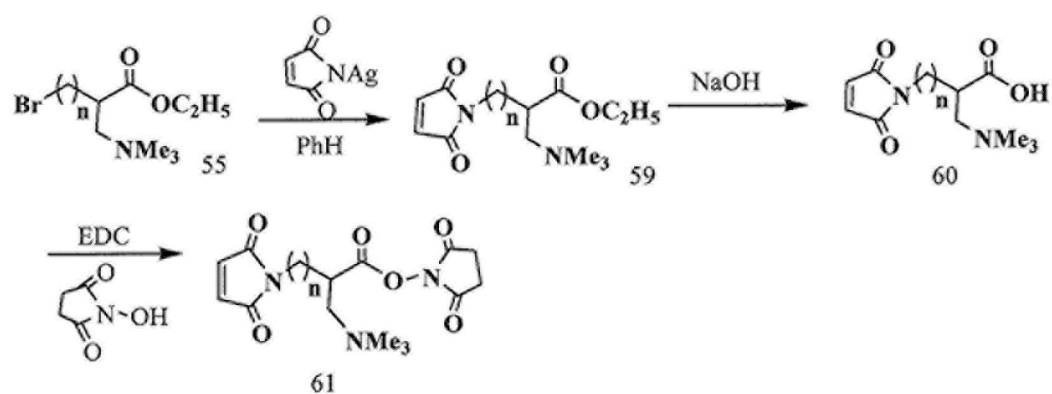
Figura 13**Figura 14**

Figura 15

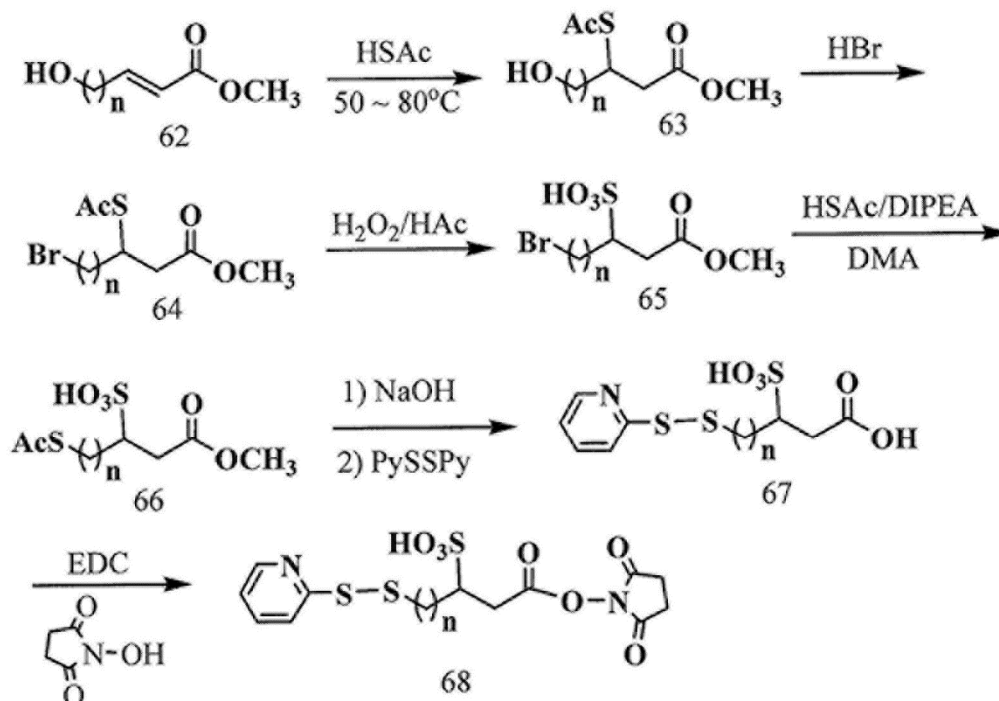


Figura 16

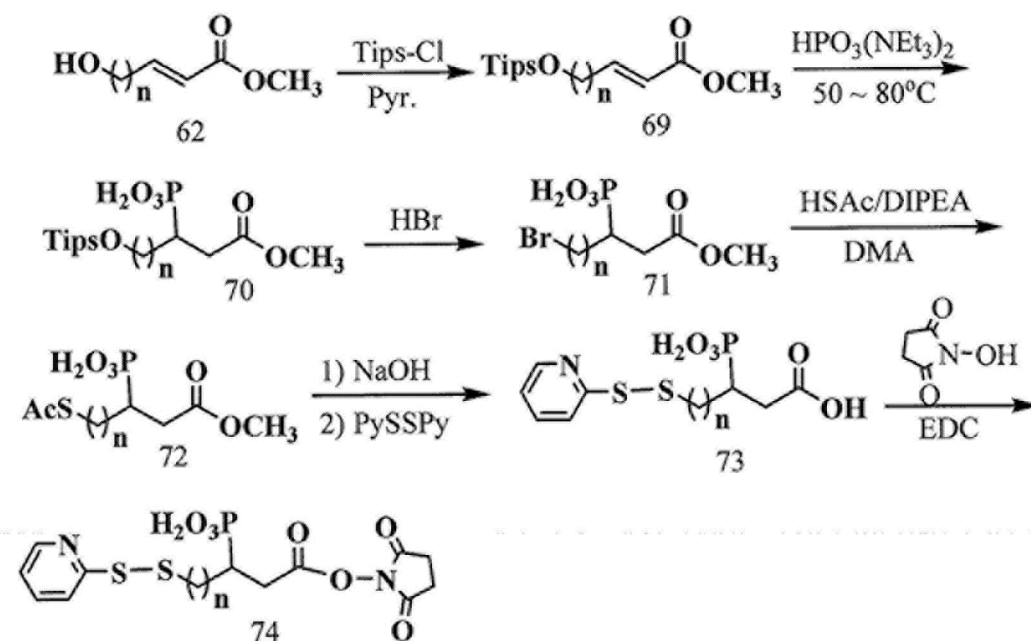


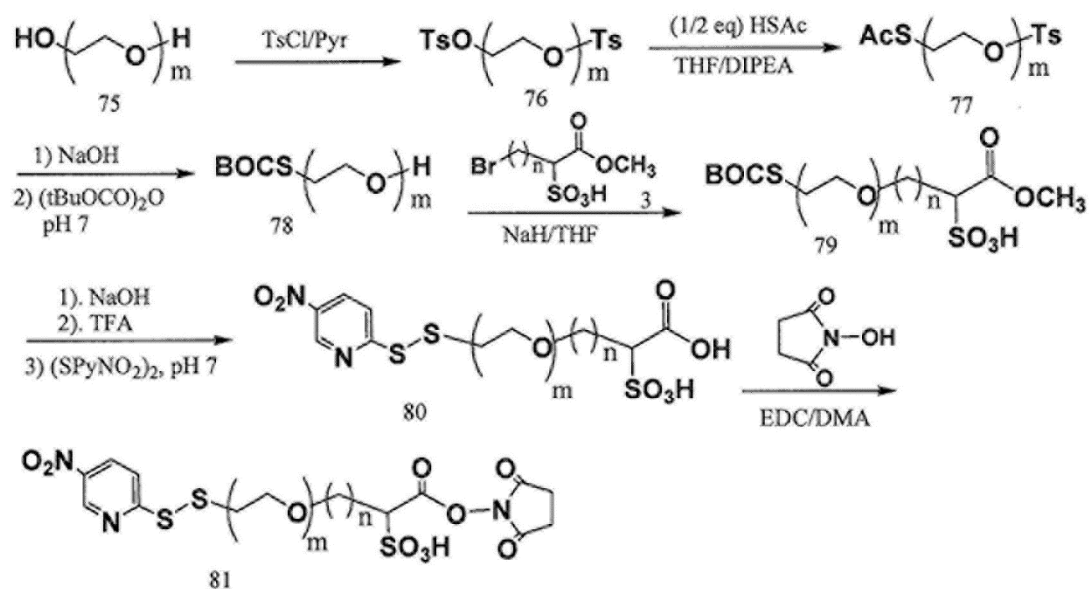
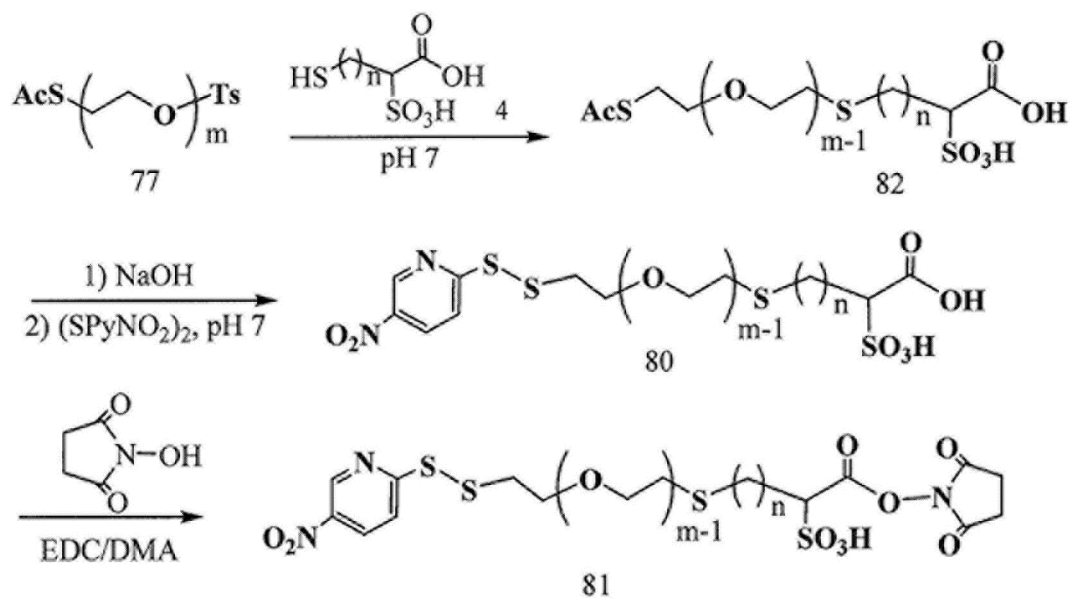
Figura 17**Figura 18**

Figura 19

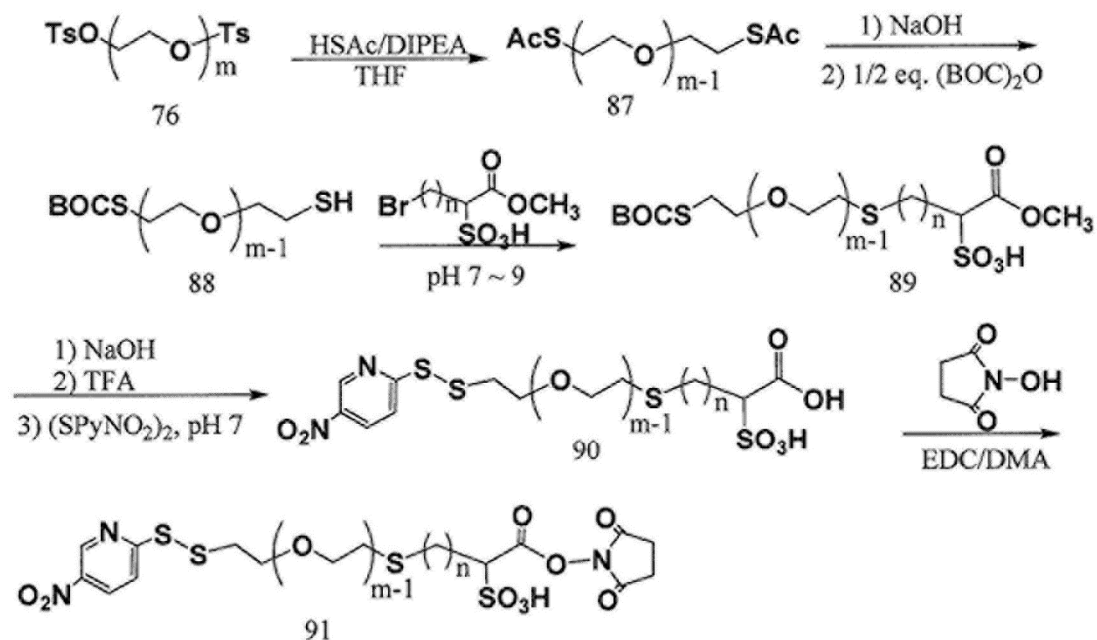


Figura 20

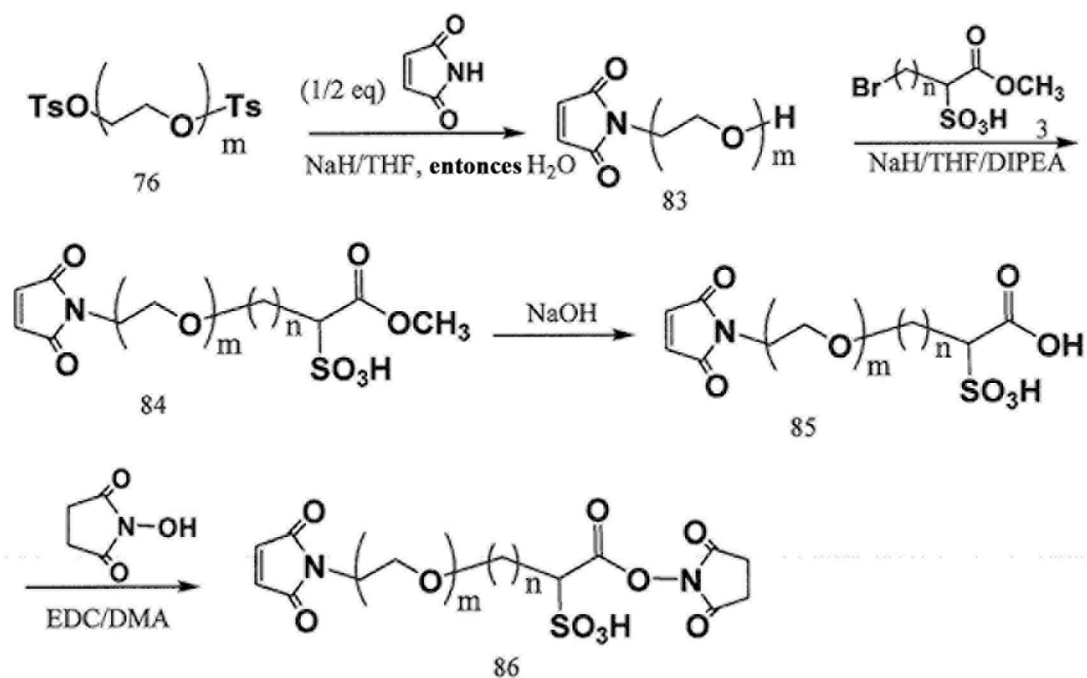


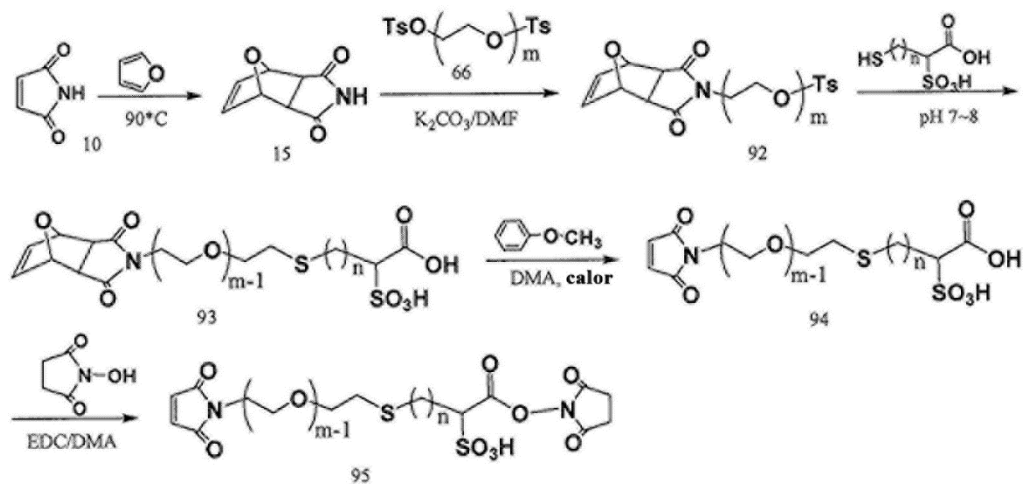
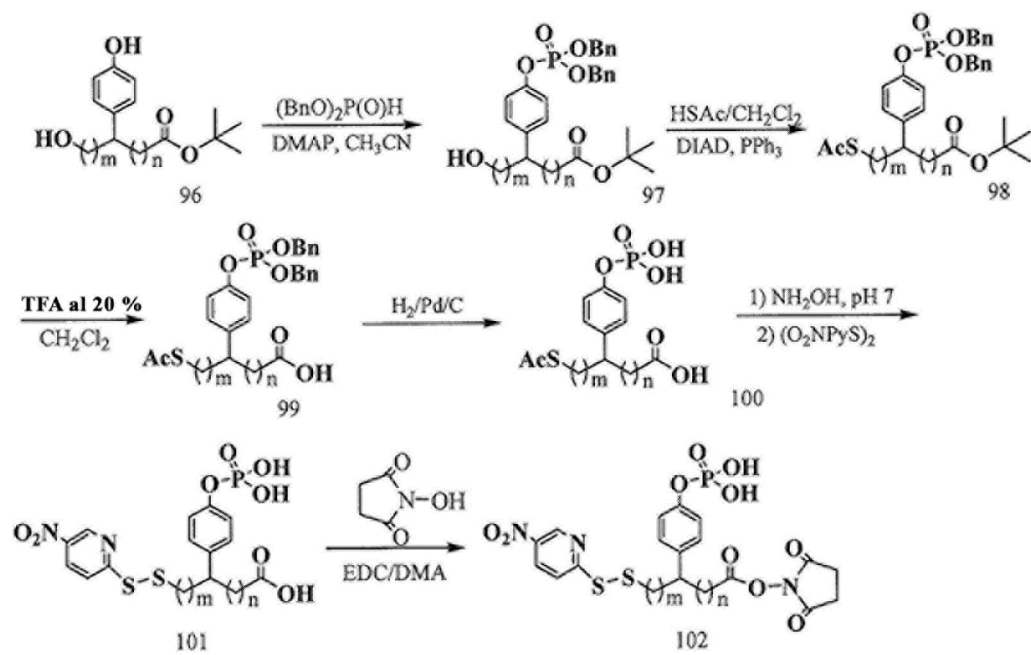
Figura 21**Figura 22**

Figura 23

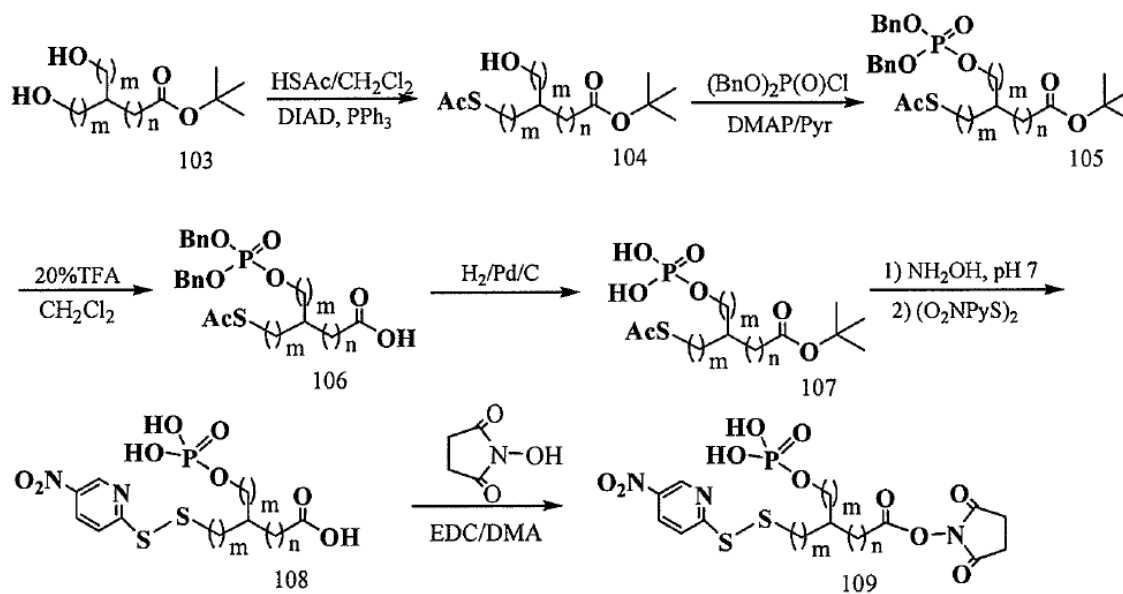


Figura 24

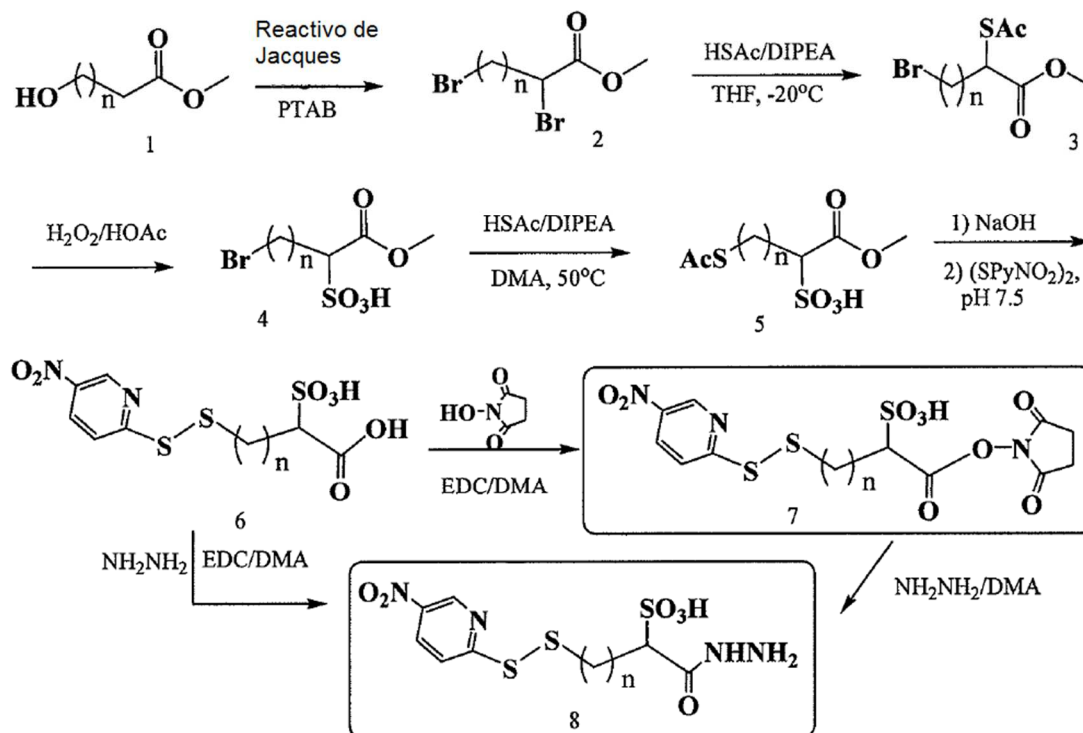


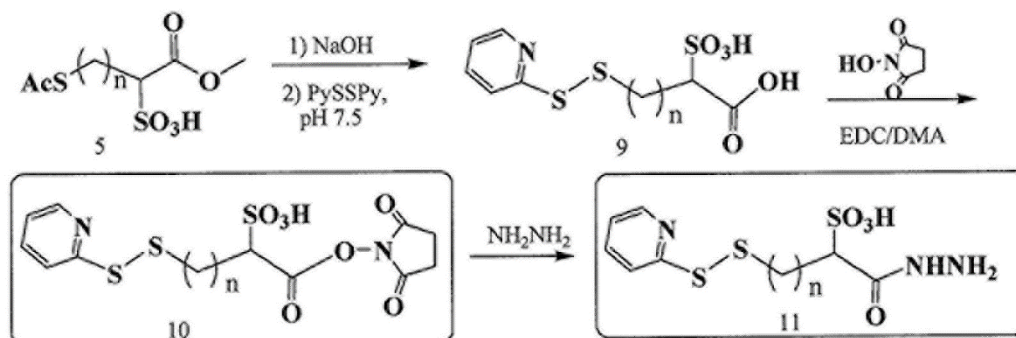
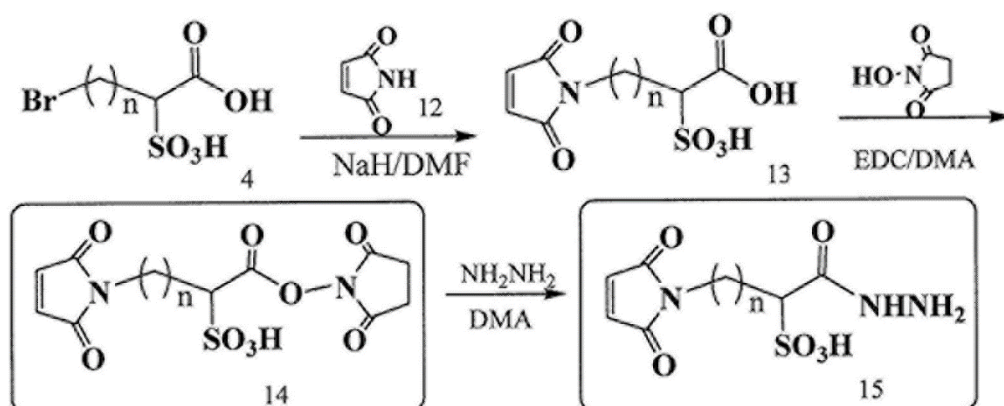
Figura 25**Figura 26**

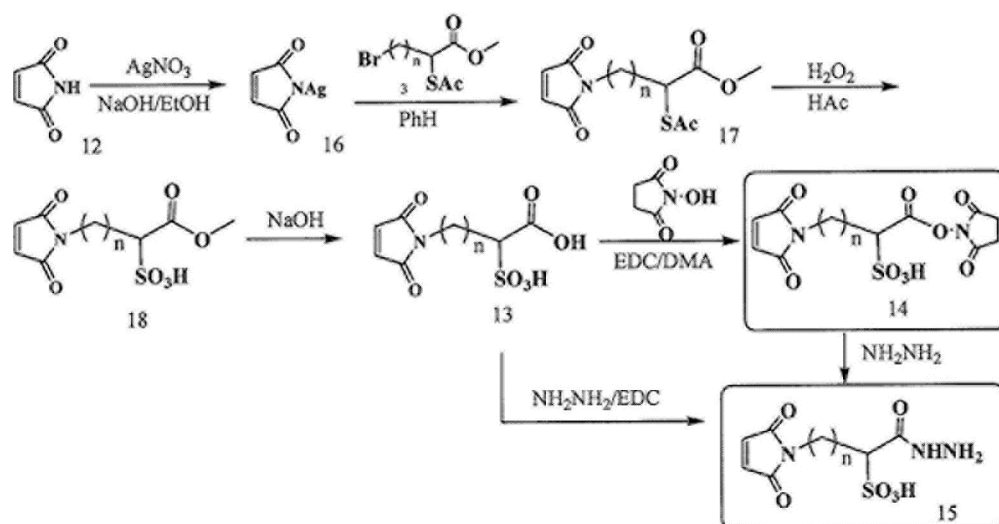
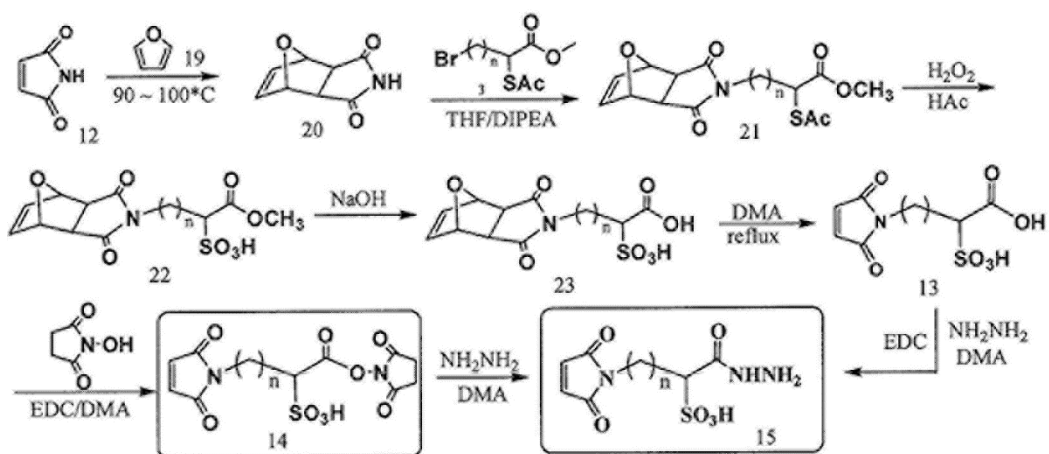
Figura 27**Figura 28**

Figura 29

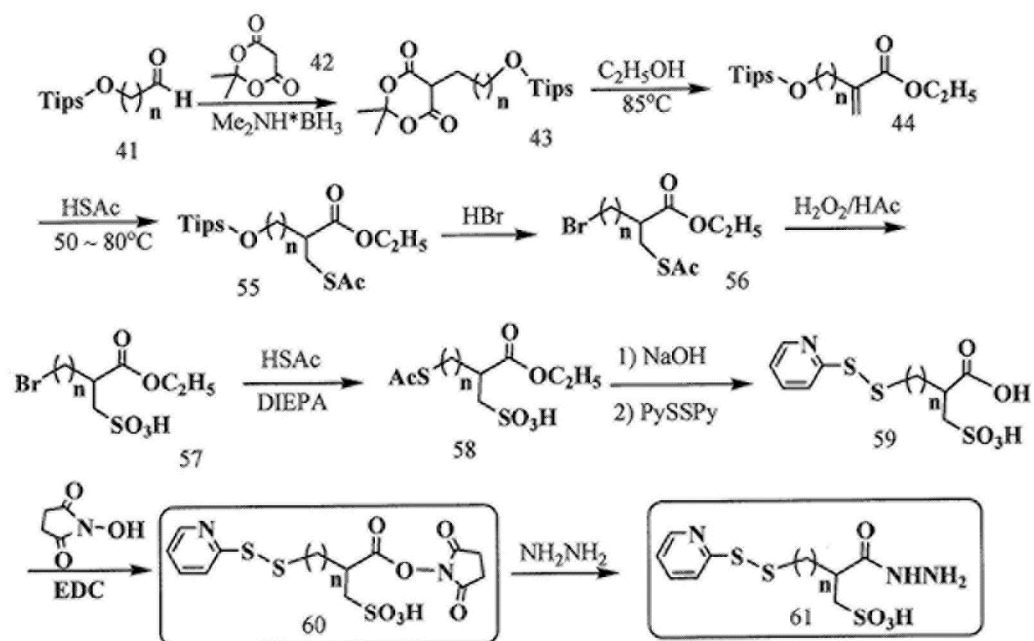


Figura 30

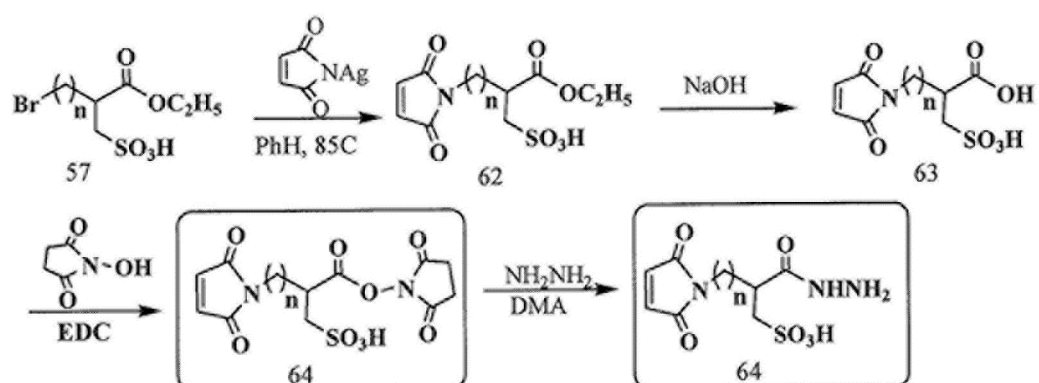


Figura 31

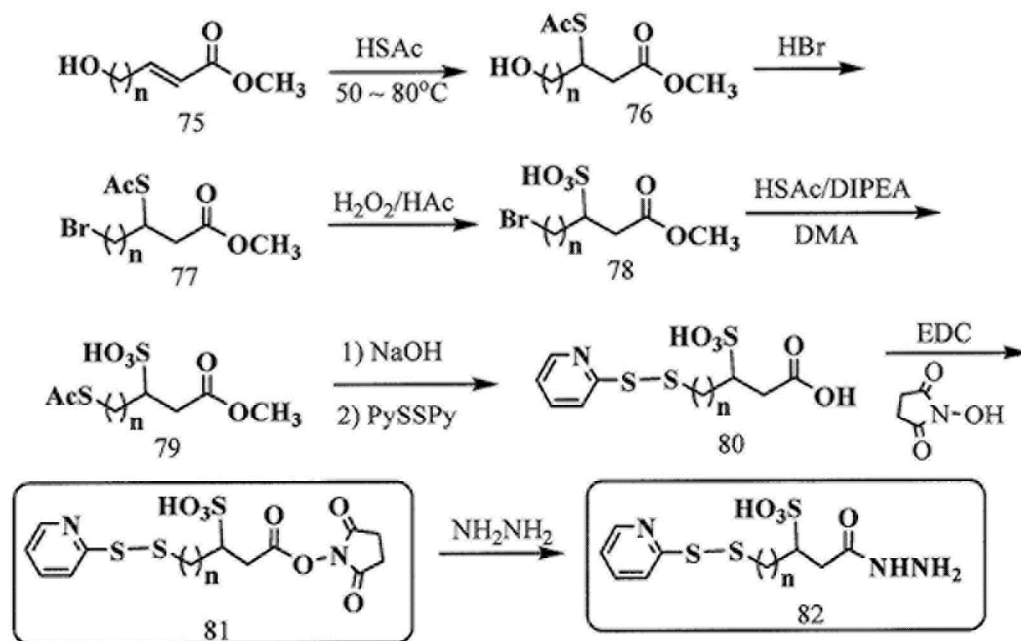


Figura 32

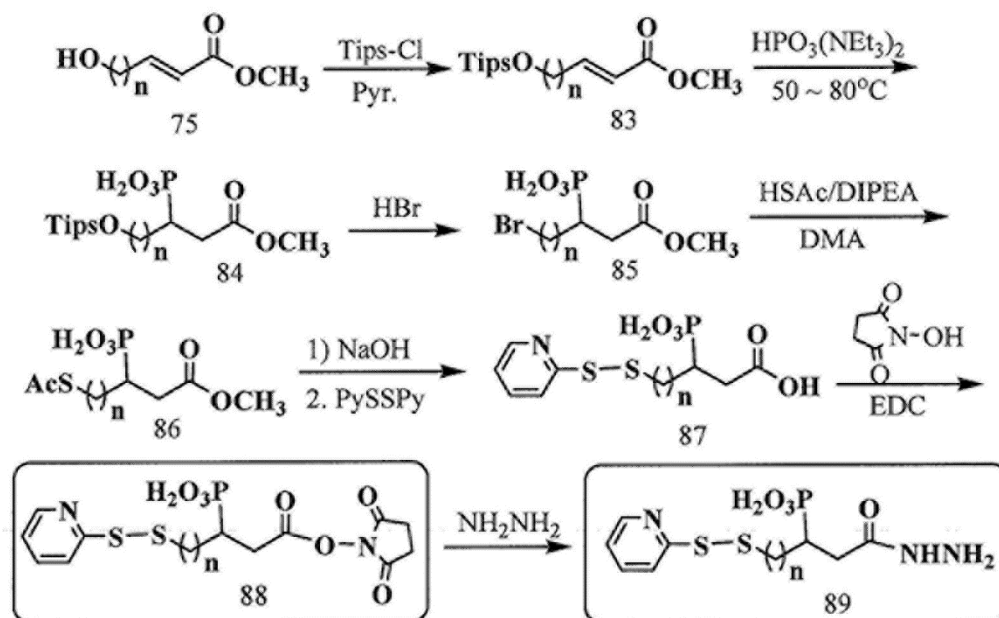


Figura 33

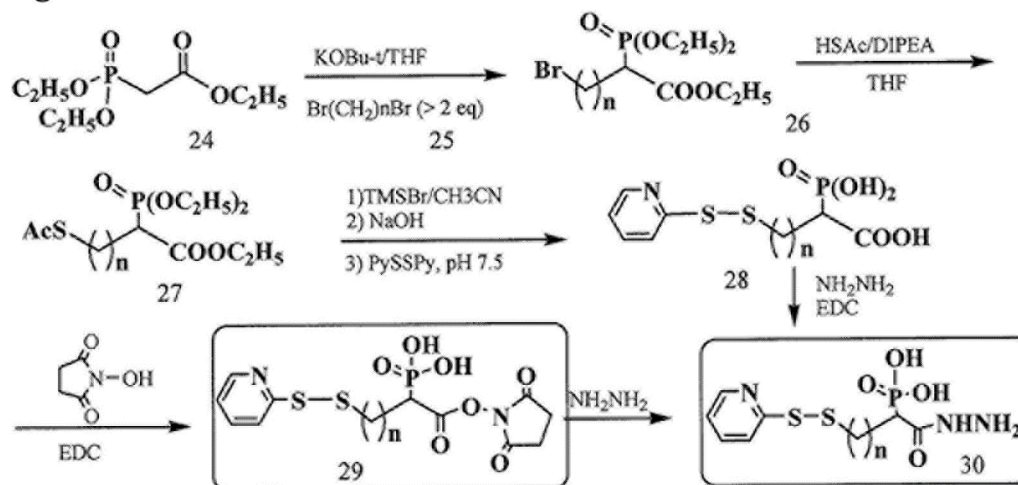


Figura 34

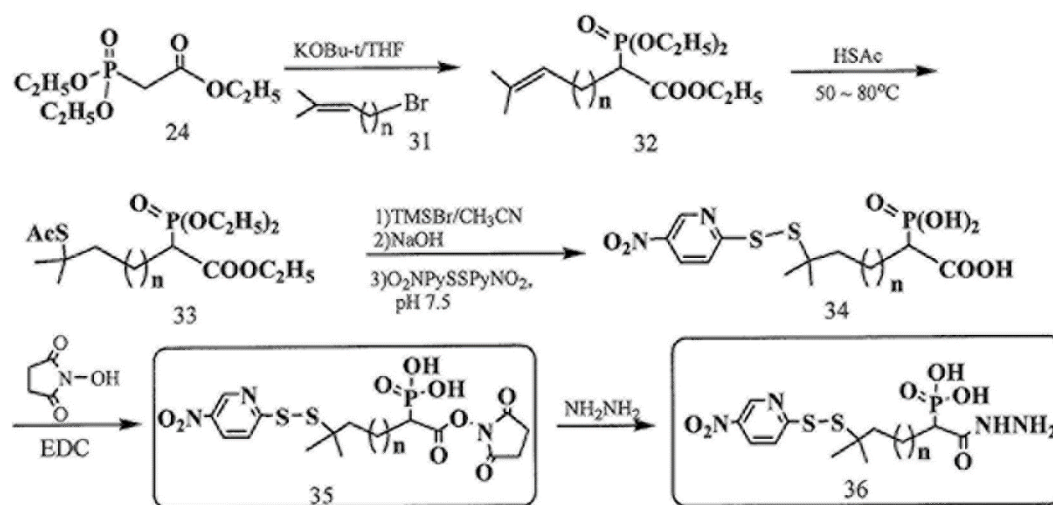


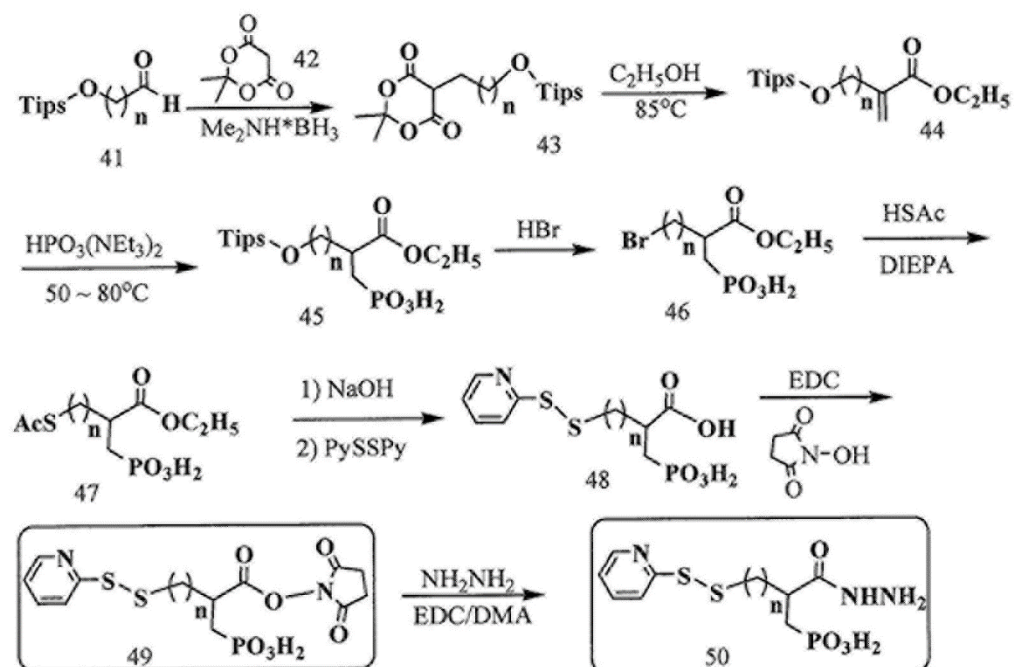
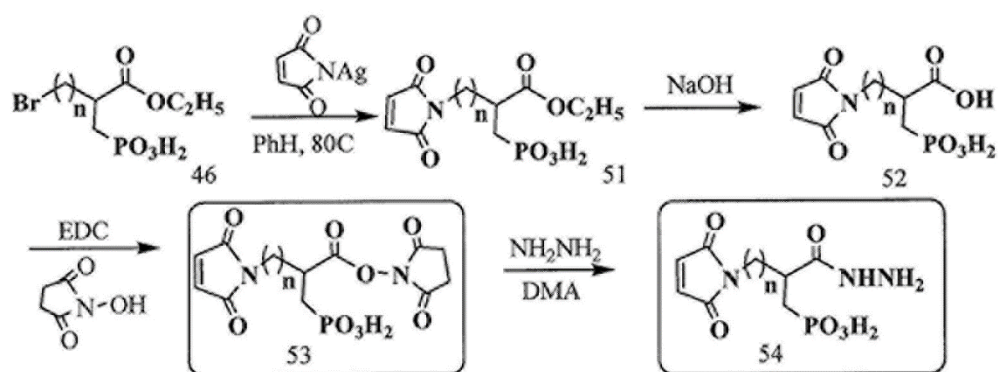
Figura 35**Figura 36**

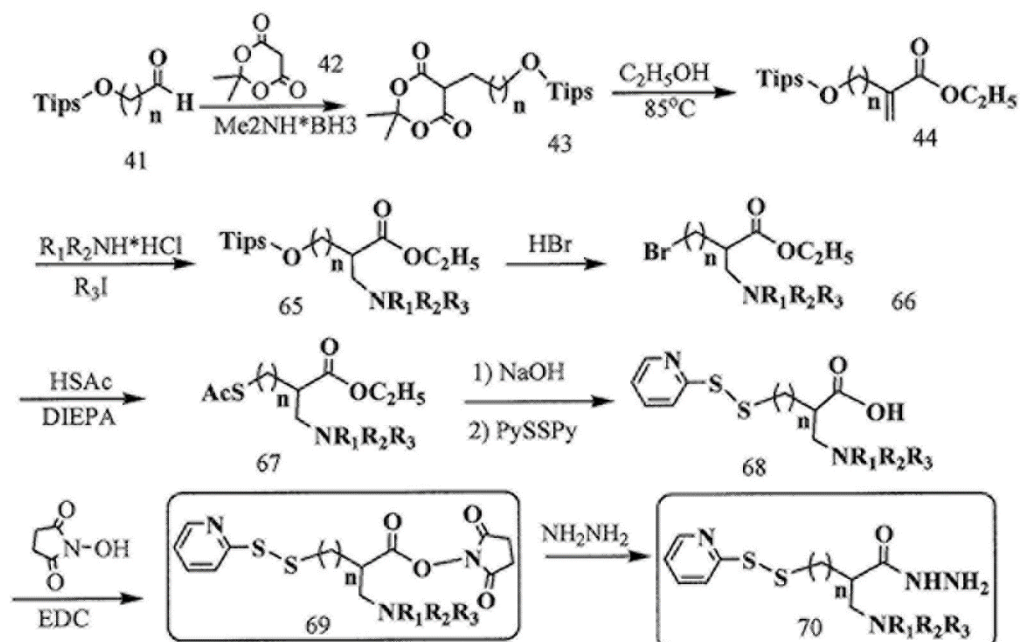
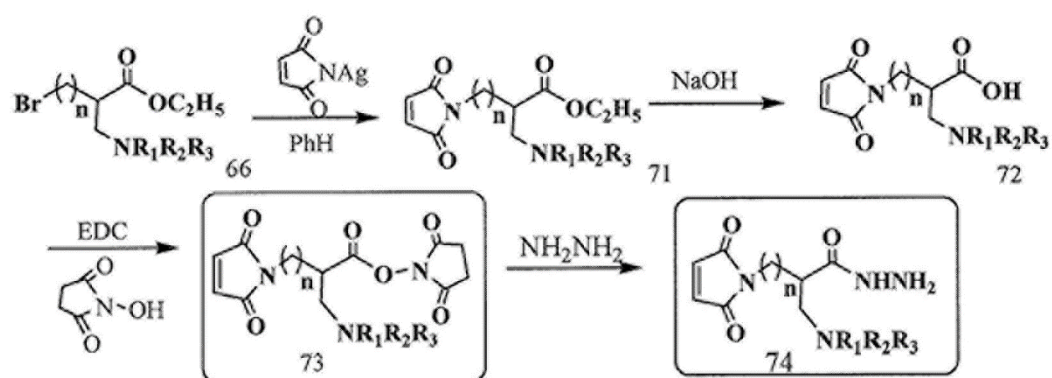
Figura 37**Figura 38**

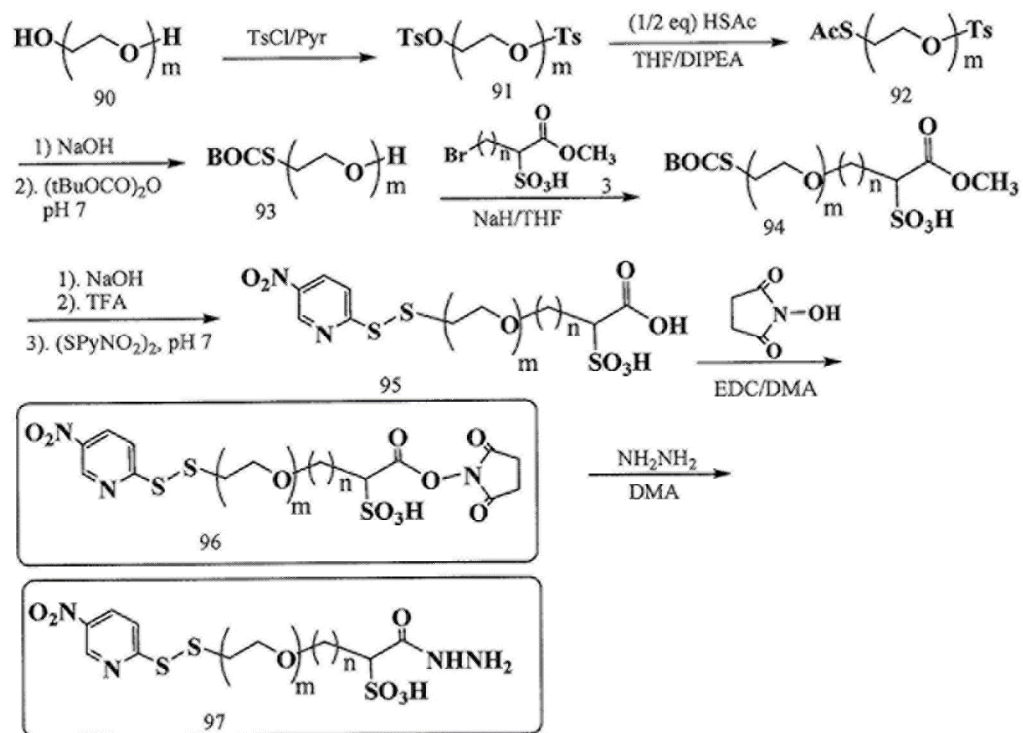
Figura 39

Figura 40

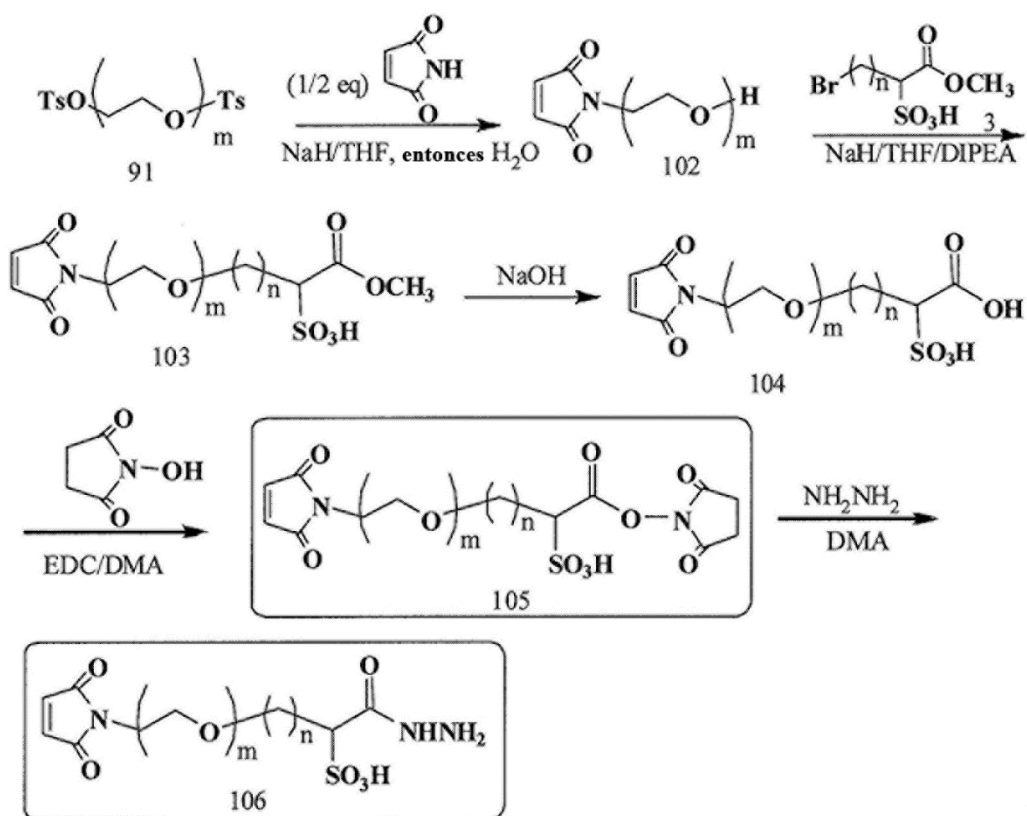


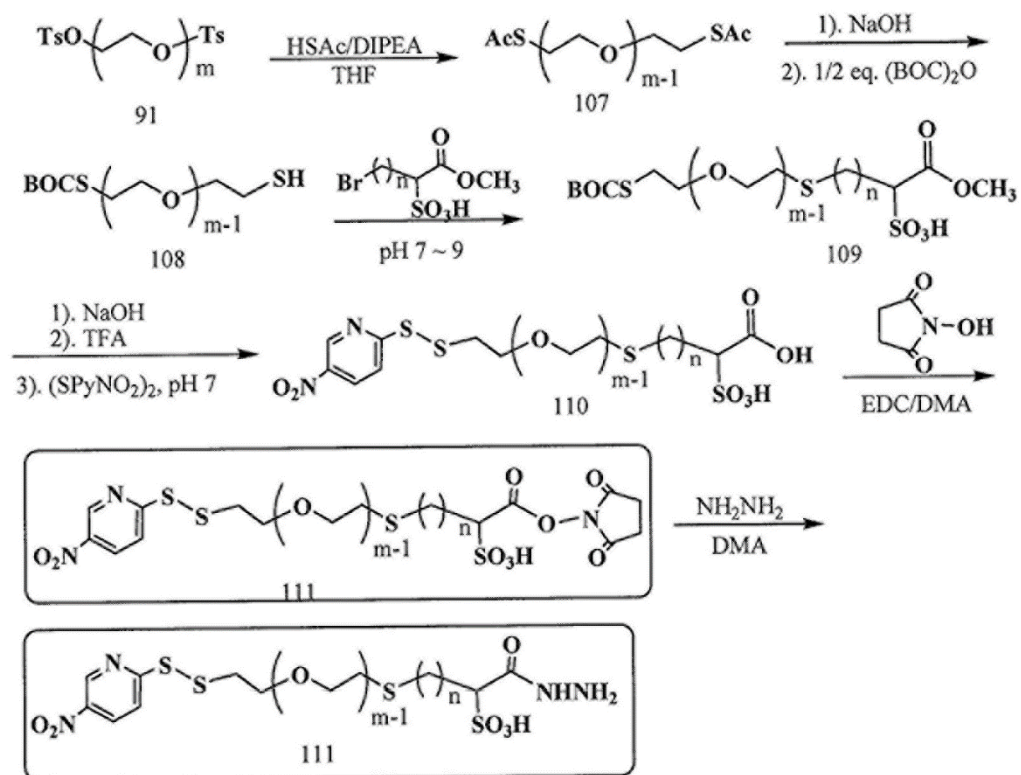
Figura 41

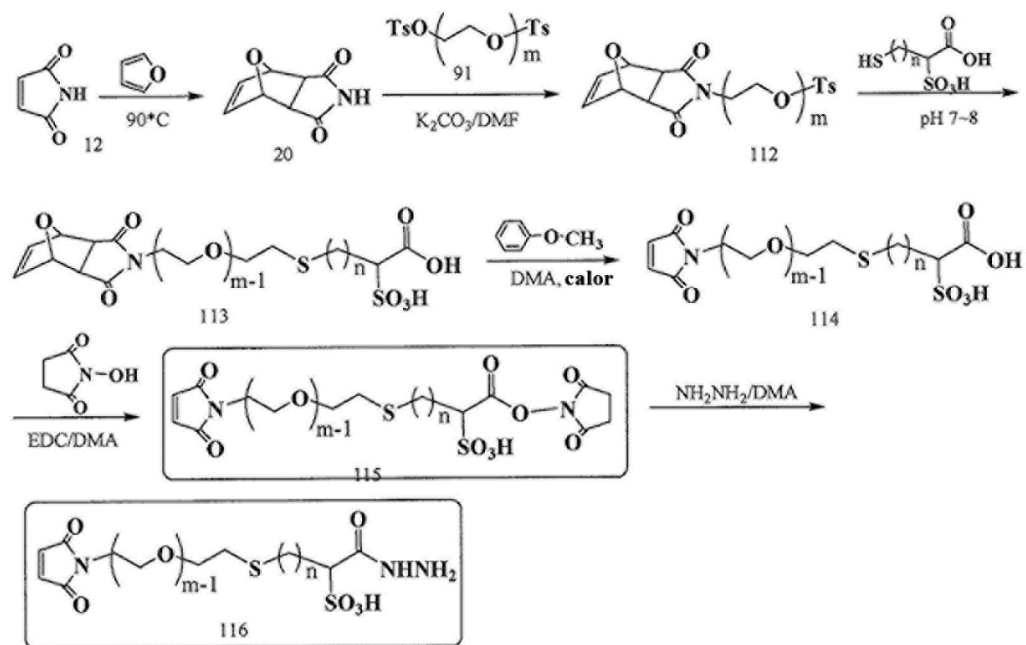
Figura 42

Figura 43

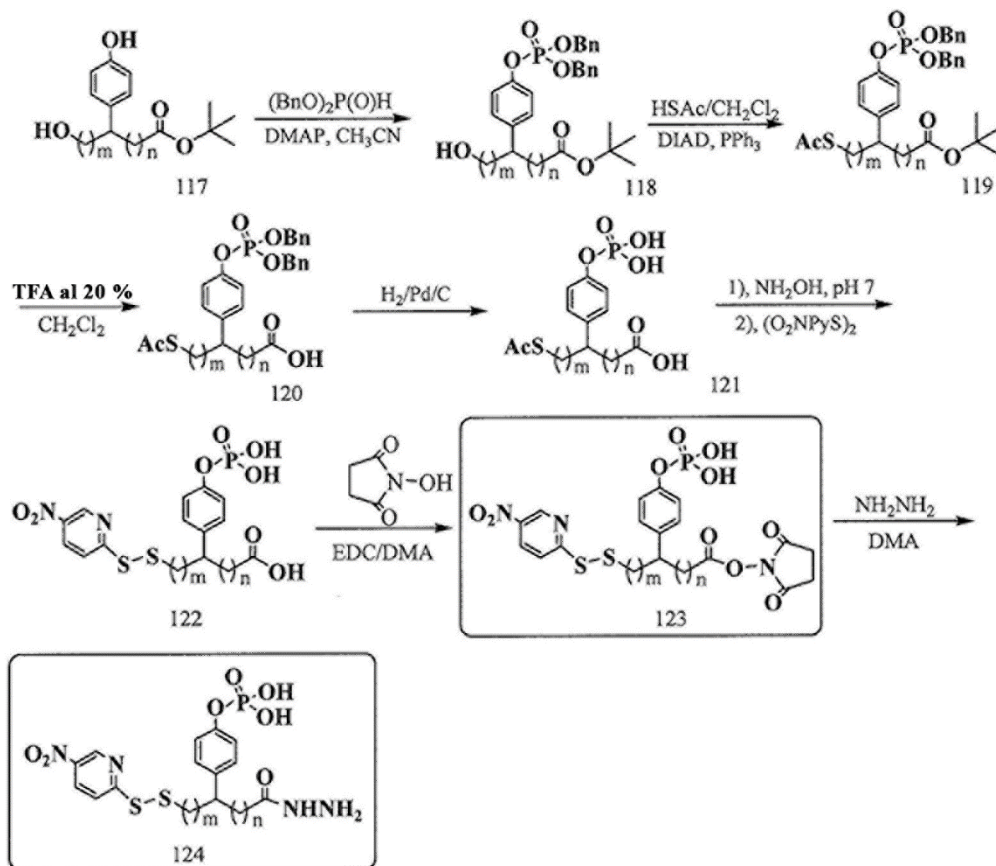


Figura 44

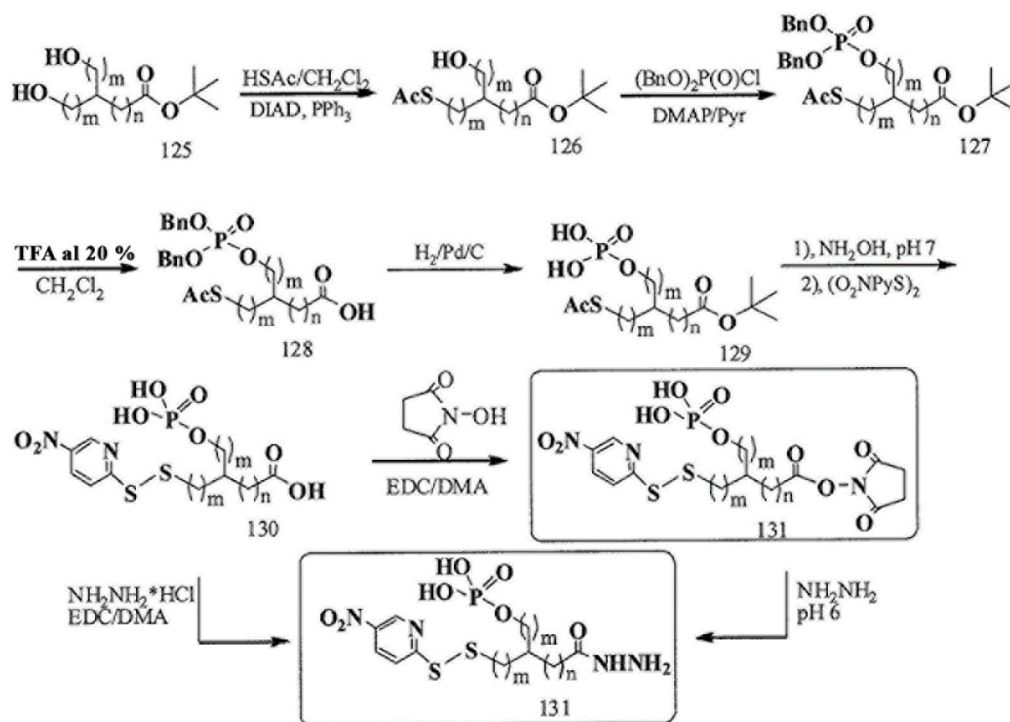


Figura 45

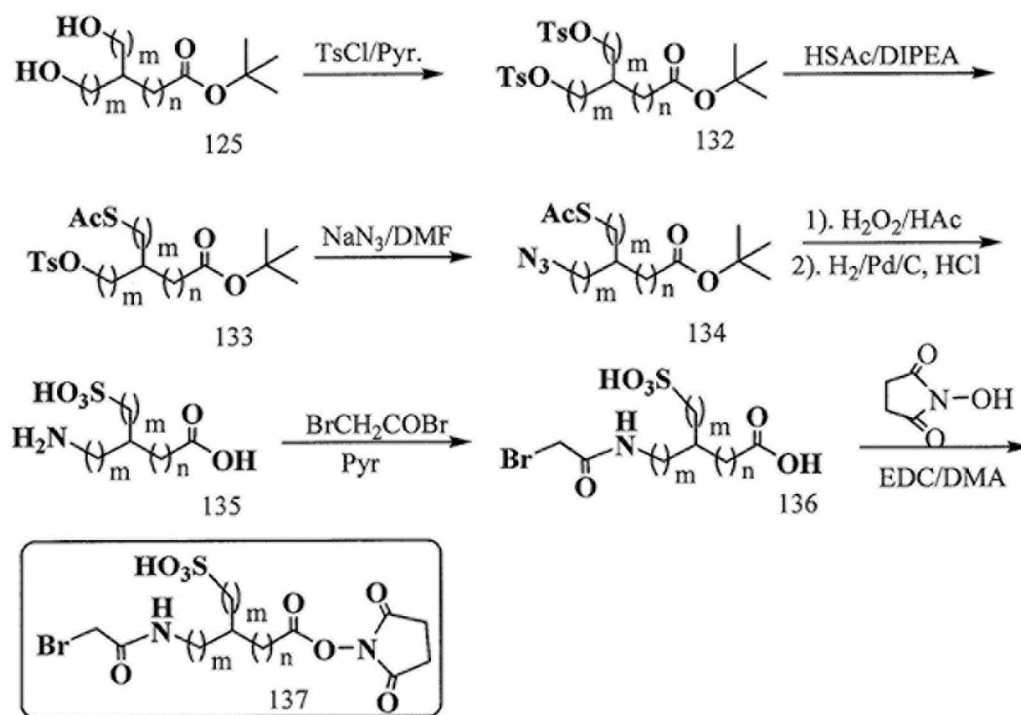


Figura 46

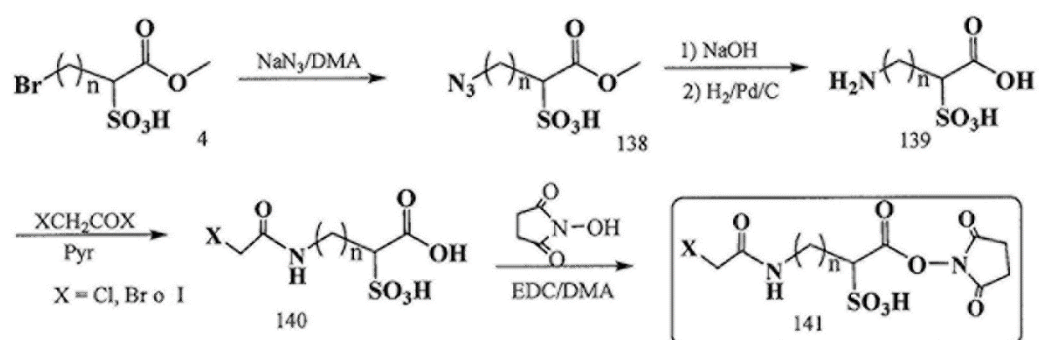


Figura 47

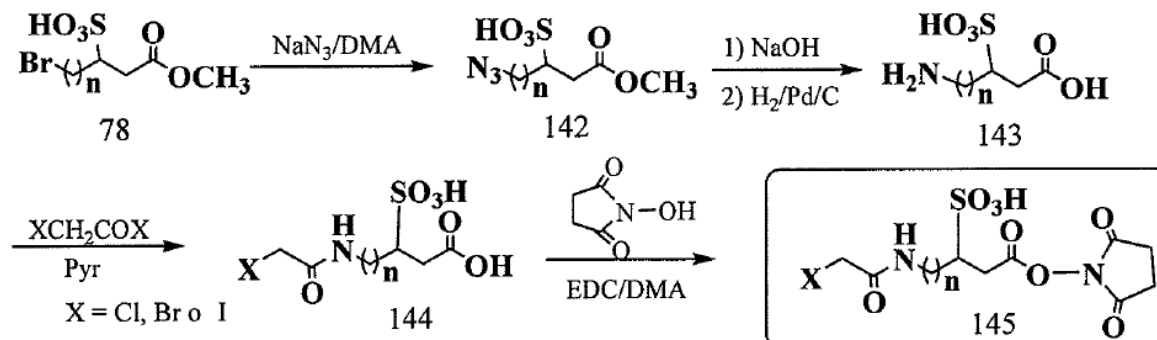


Figura 48

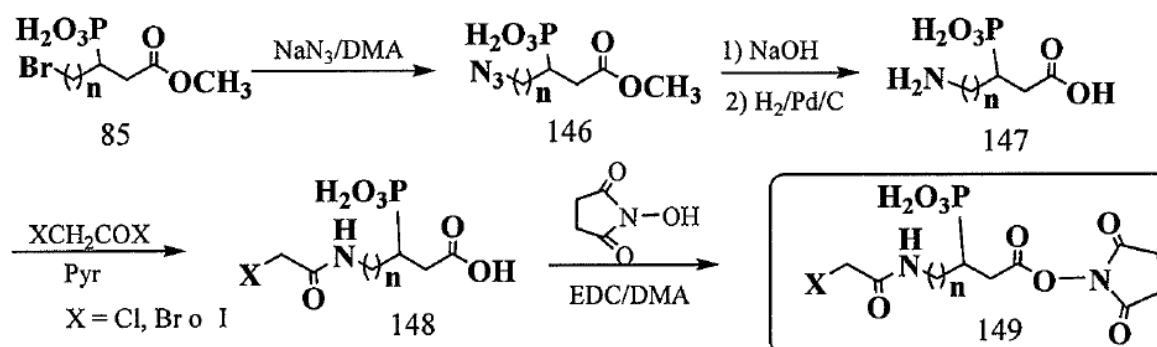
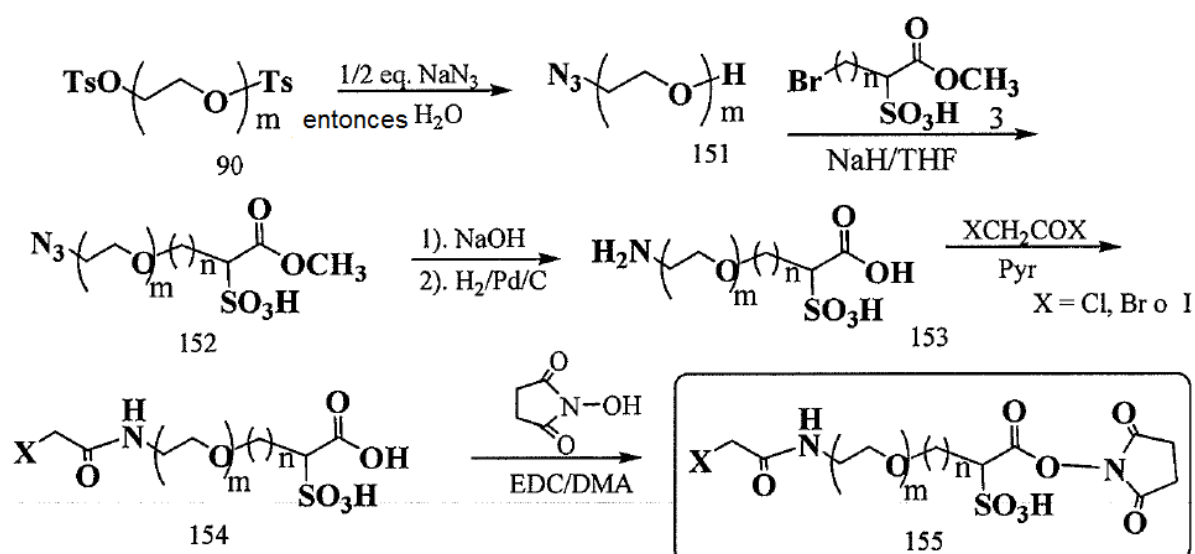


Figura 49



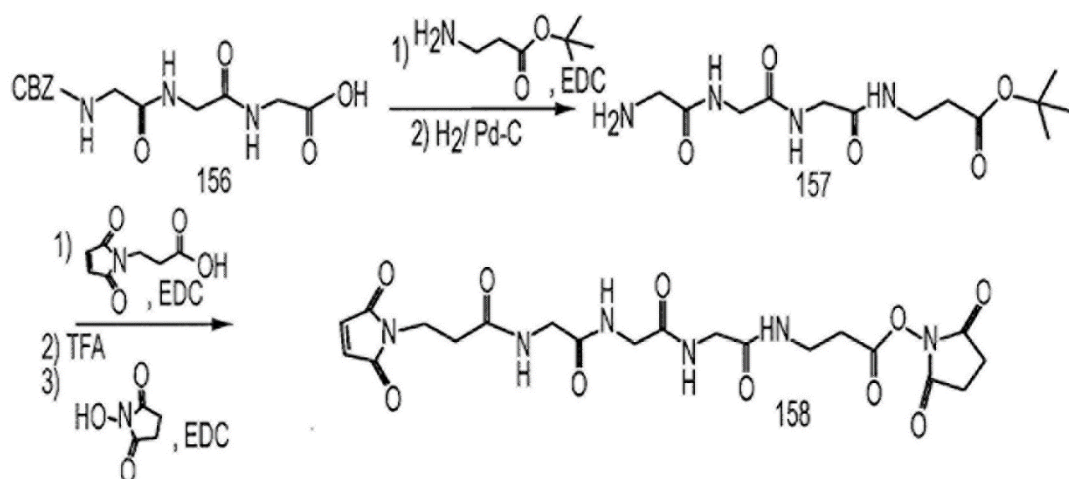


FIG. 50

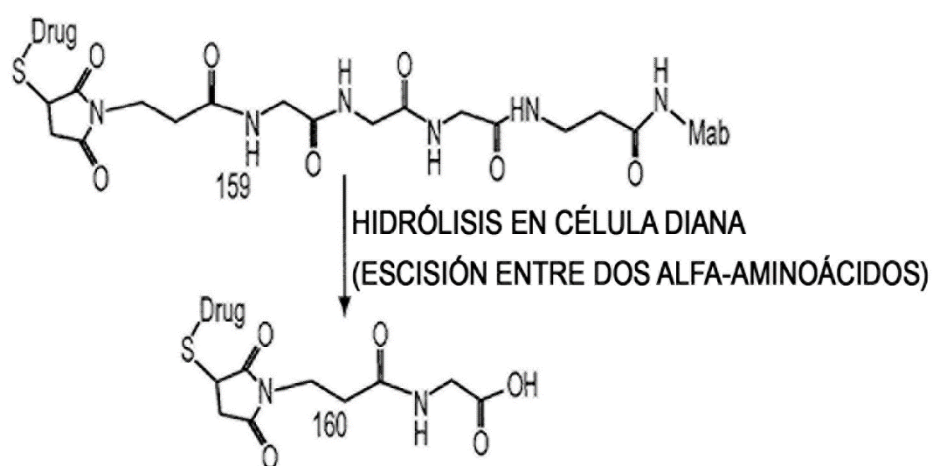


FIG. 51

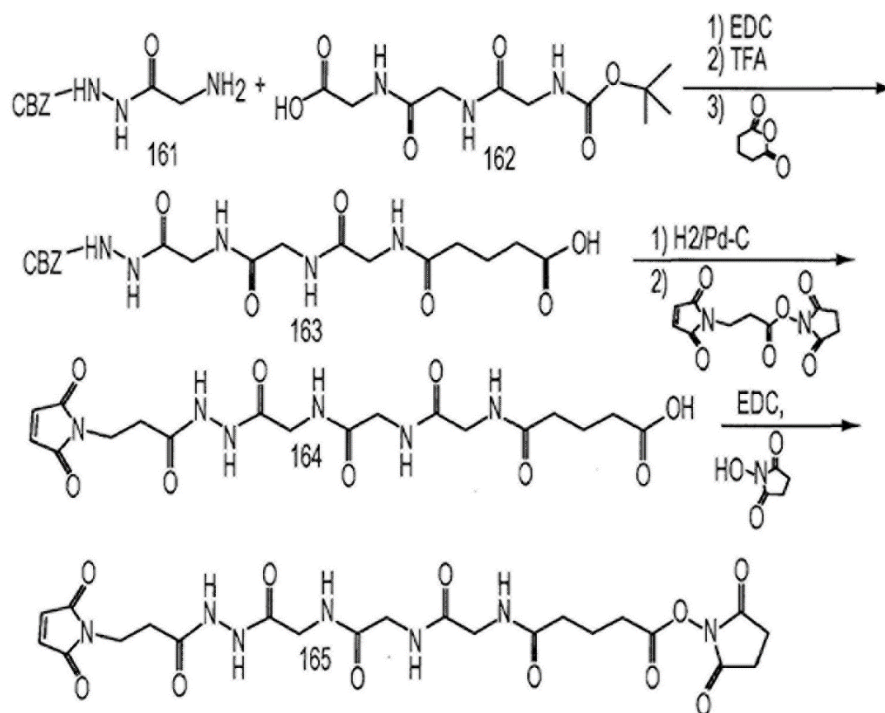


FIG. 52

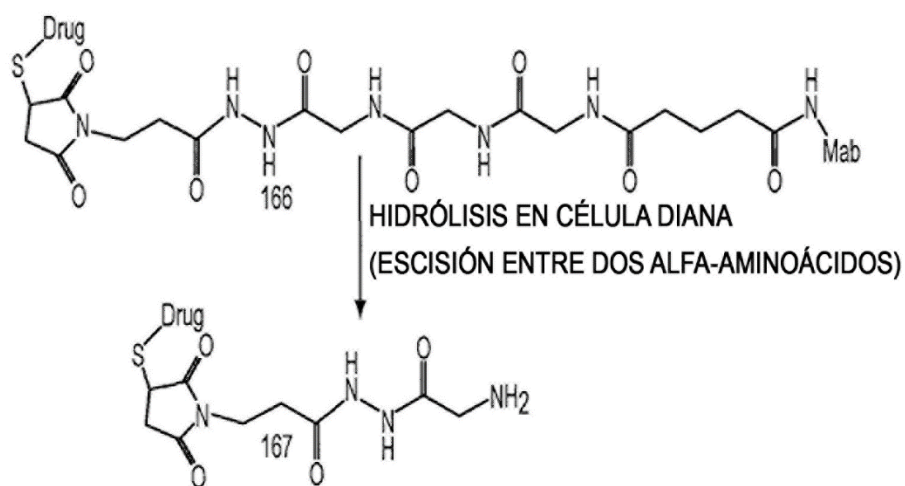


FIG. 53

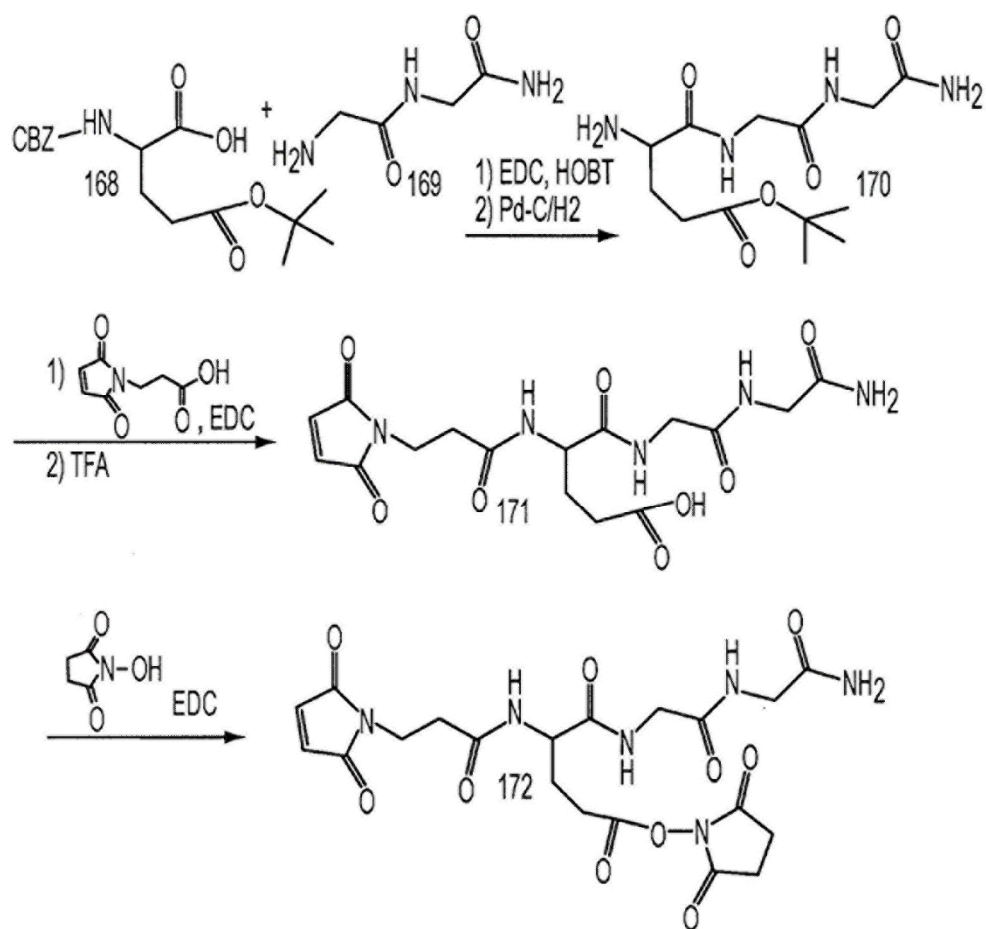


FIG. 54

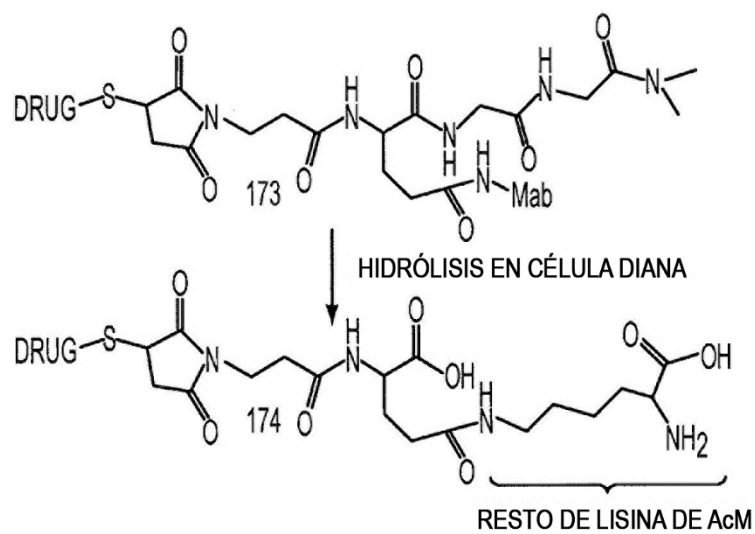


FIG. 55

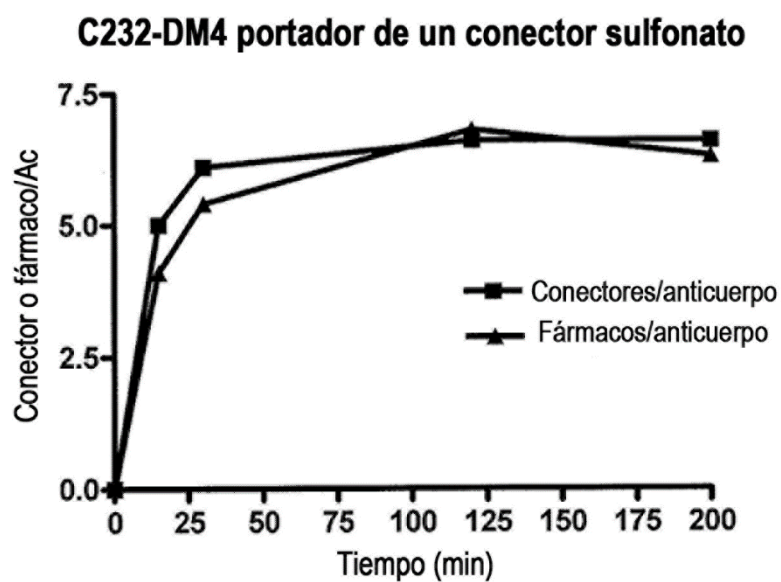
Figura 56

Figura 57(A) Citotoxicidad de conjugados de anticuerpo anti-CD56(huN901)-maitansinoide

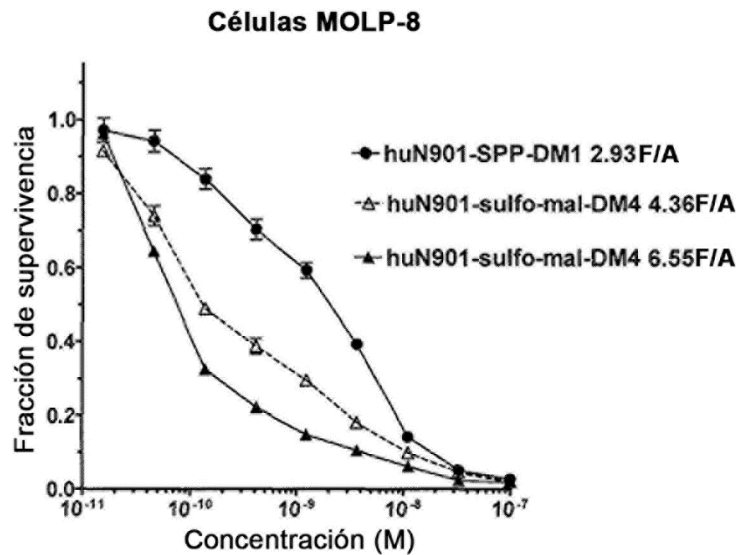


Figura 57(B) Citotoxicidad de conjugados de anticuerpo anti-CD56(huN901)-maitansinoide

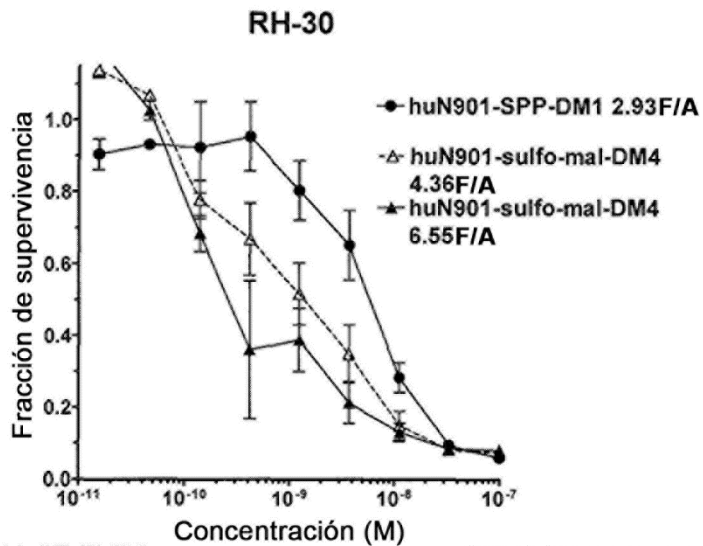
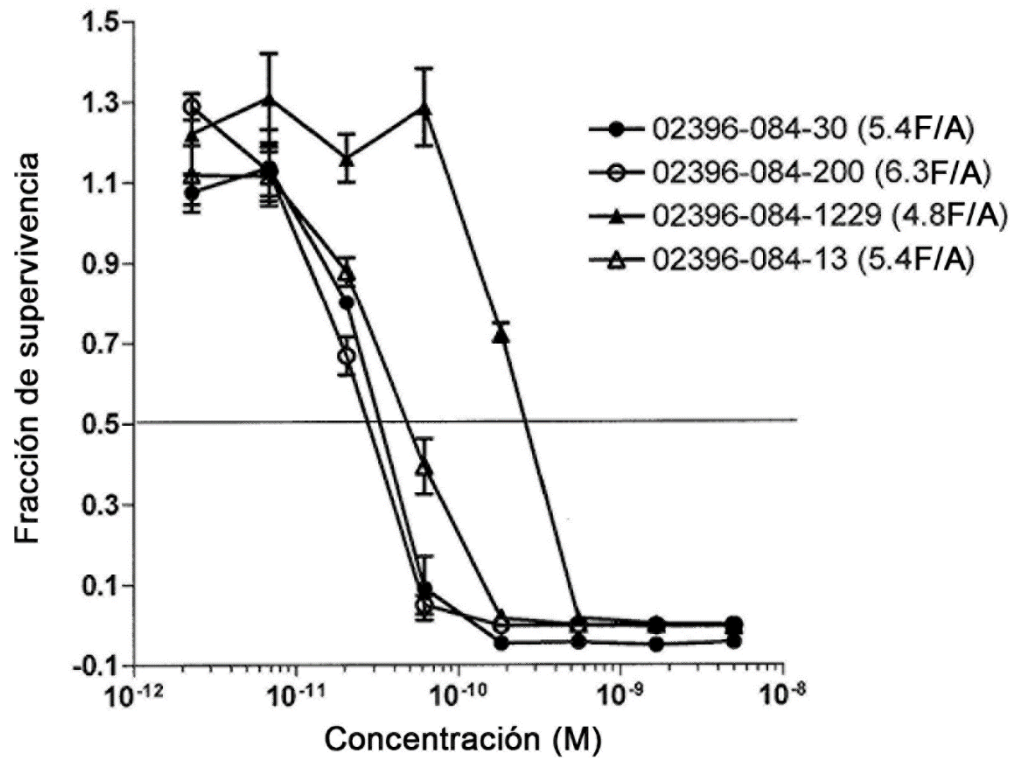
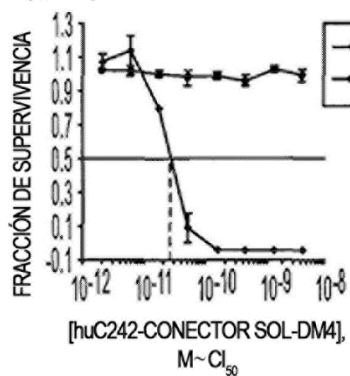


Figura 57(C) Citotoxicidad de conjugados de anticuerpo anti-CD56(huN901)-maitansinoide

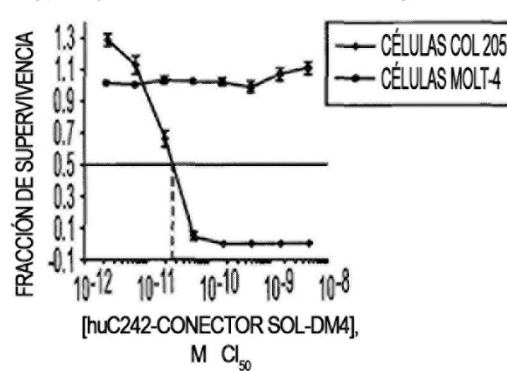


CITOTOXICIDAD: huC242-CONECTOR SULFONATO-DM4
(5,4 F/A) FRENTE A CÉLULAS COLO 205 y MOLT-4



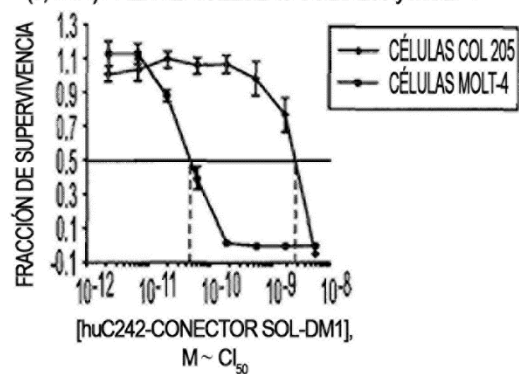
CÉLULAS COL 205	$3.3e-11$ M
CÉLULAS MOLT-4	$> 6.0e-9$ M

CITOTOXICIDAD: huC242-CONECTOR SULFONATO-DM4
(6,3 F/A) FRENTE A CÉLULAS COLO 205 y MOLT-4



CÉLULAS COL 205	$2.9e-11$ M
CÉLULAS MOLT-4	$> 6.0e-9$ M

CITOTOXICIDAD: huC242-CONECTOR SULFONATO-DM1
(5,4 F/A) FRENTE A CÉLULAS COLO 205 y MOLT-4



CÉLULAS COL 205	$4.8e-11$ M
CÉLULAS MOLT-4	$2.3e-9$ M

FIG. 58

ANÁLISIS ESPECTRAL DE MASAS DE CONJUGADO DE huC242-CONECTOR SULFONATO-DM1

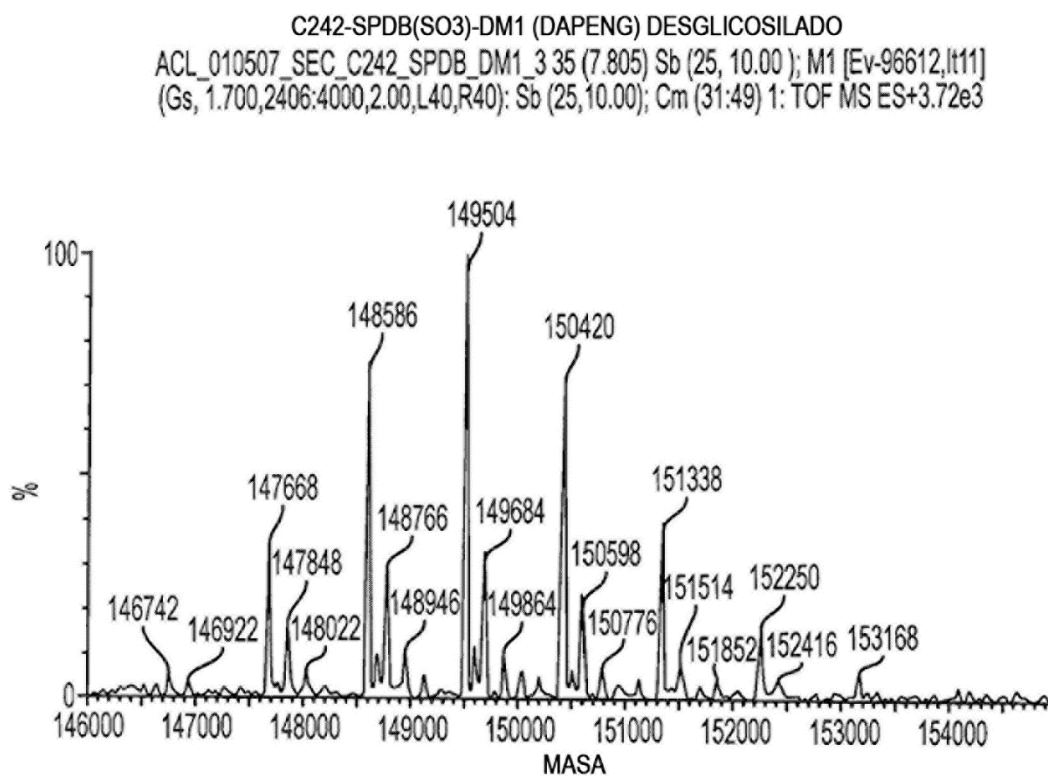


FIG. 59

Figura 60

Citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-conector sulfonato-maitansinoide con carga creciente de maitansinoides (E:A) frente a células COLO 205

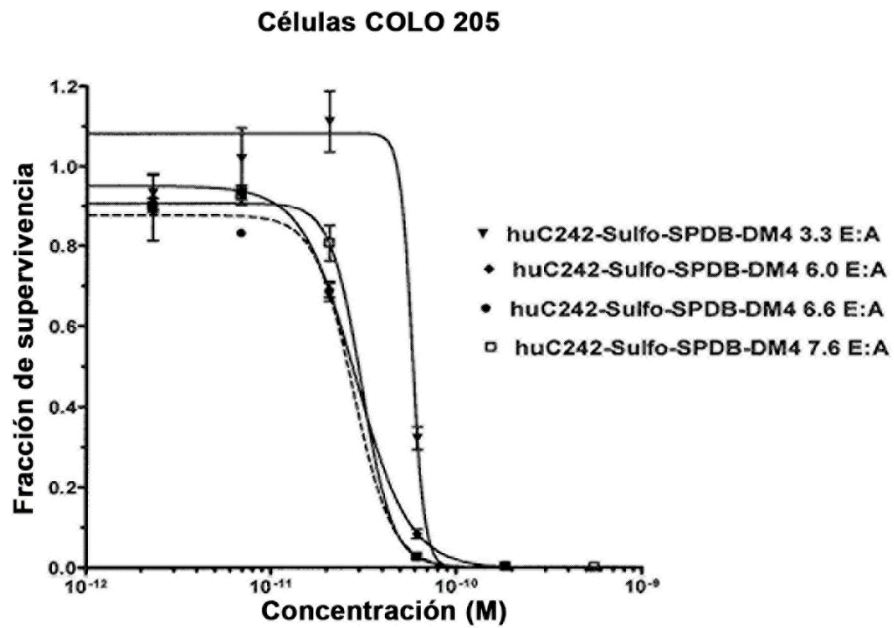


Figura 61

Citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-conector sulfonato-maitansinoide con carga creciente de maitansinoides (E:A) frente a células COLO 205-MDR multifarmacorresistentes

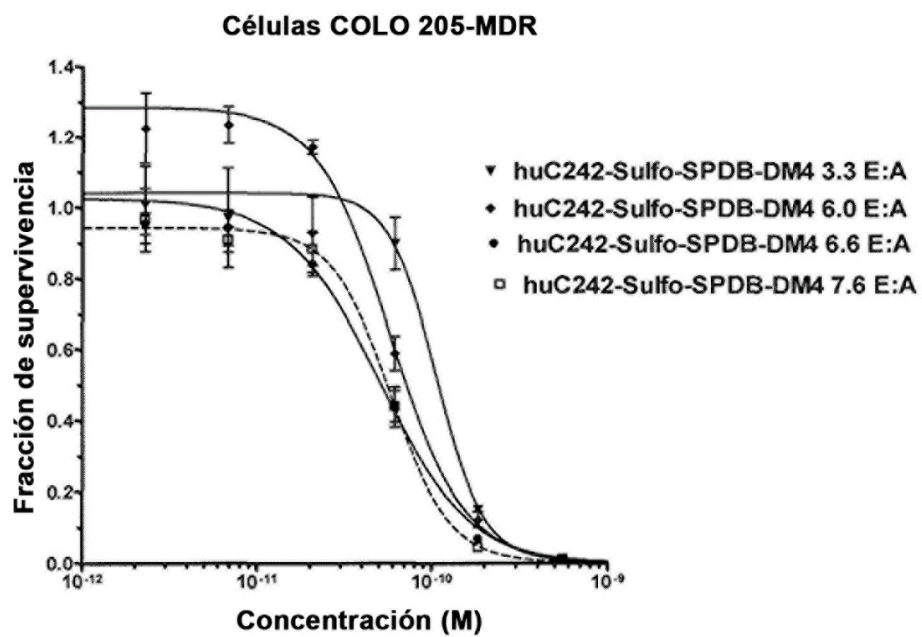


Figura 62

Citotoxicidad de conjugados de anti-CanAg (huC242)-maitansinoide con o sin conector sulfonato frente a células COLO 205-MDR multifarmacorresistentes

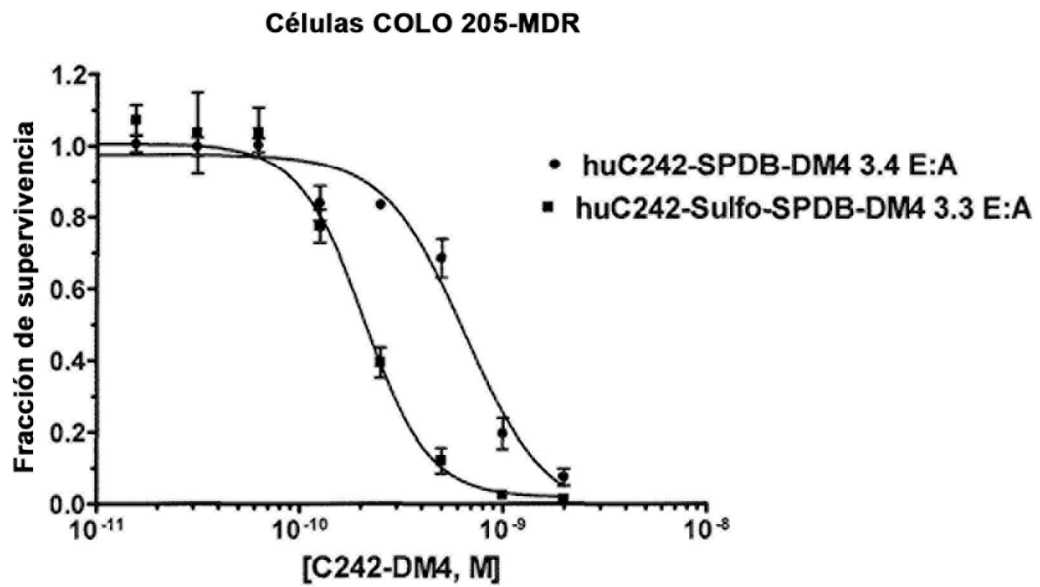


Figura 63

Citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoide con o sin conector sulfonato frente a células COLO 205-MDR multifarmacorresistentes

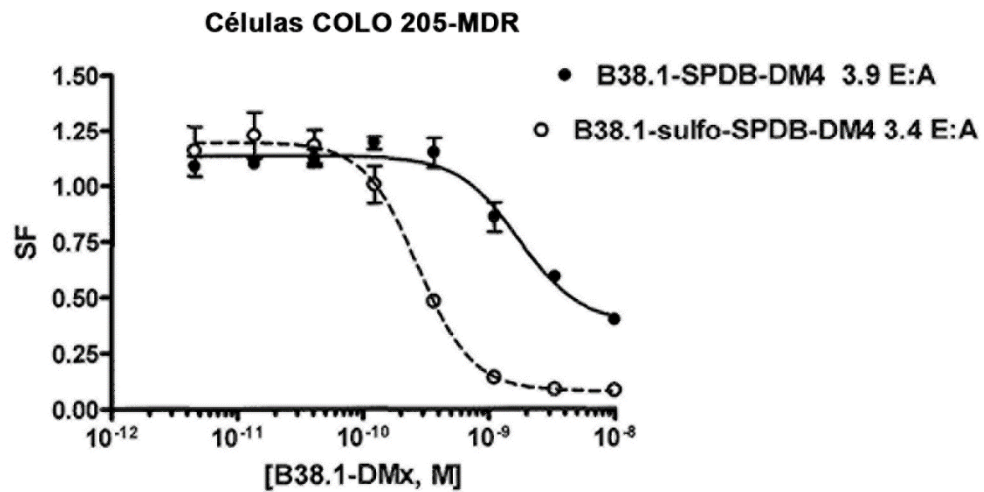


Figura 64

Citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoide con o sin conector sulfonato frente a células HCT15 multifarmacorresistentes

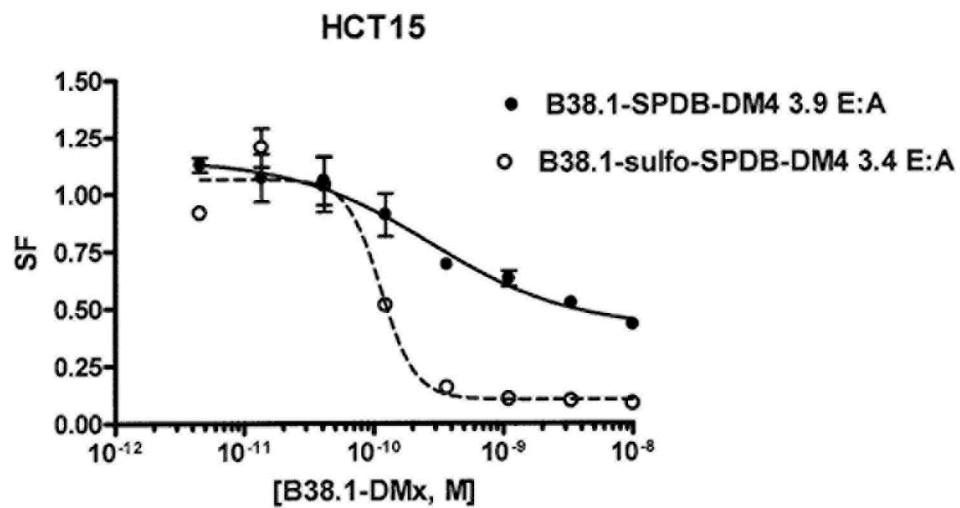


Figura 65

Citotoxicidad de conjugados de anti-EpCAM (B38.1)-maitansinoide con o sin conector sulfonato frente a células COLO205-MDR multifarmacorresistentes

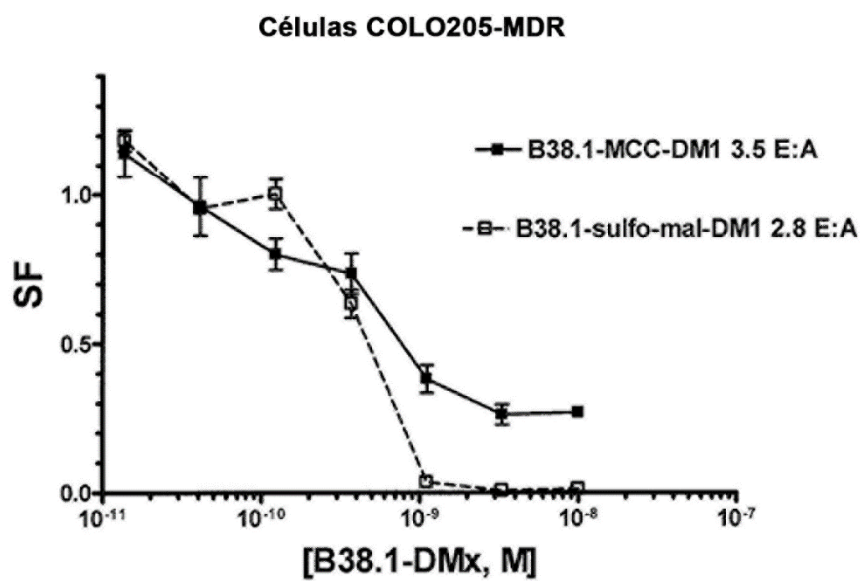
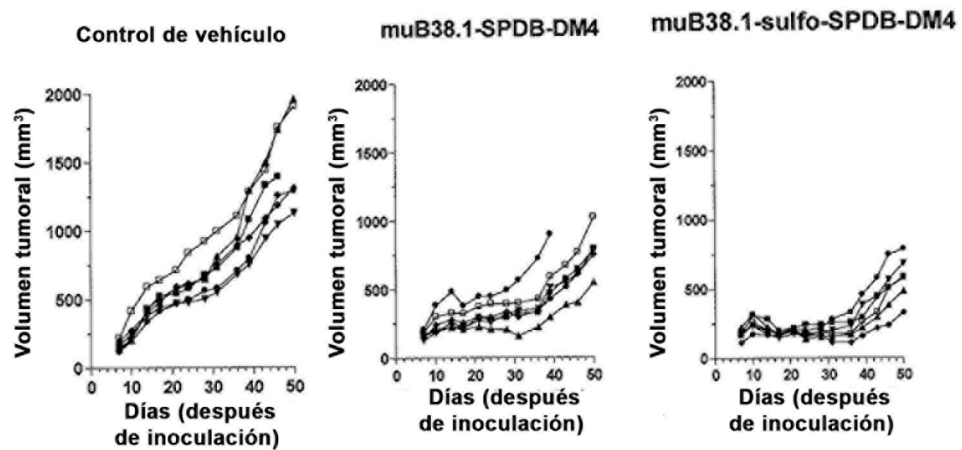


Figura 66

Actividad tumoral *in vivo* de conjugados de anticuerpo anti-EpCAM-maitansinoide sobre xenoinjertos de COLO205 *mdr* (tumores individuales)



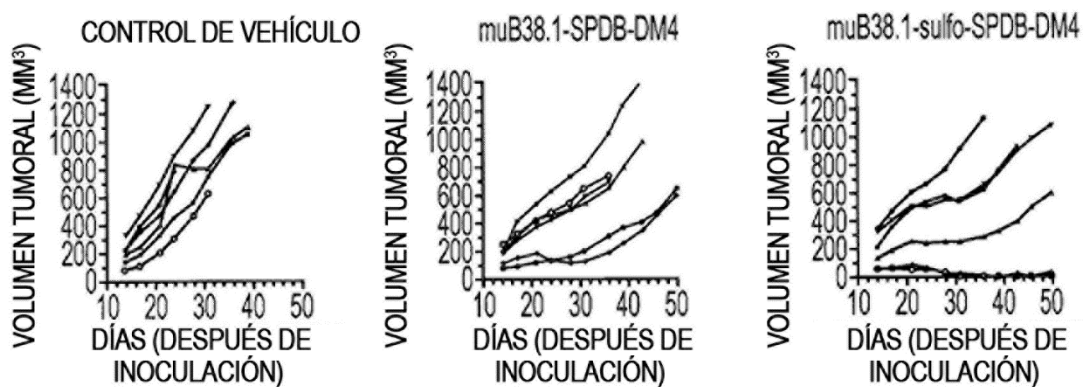


FIG. 67

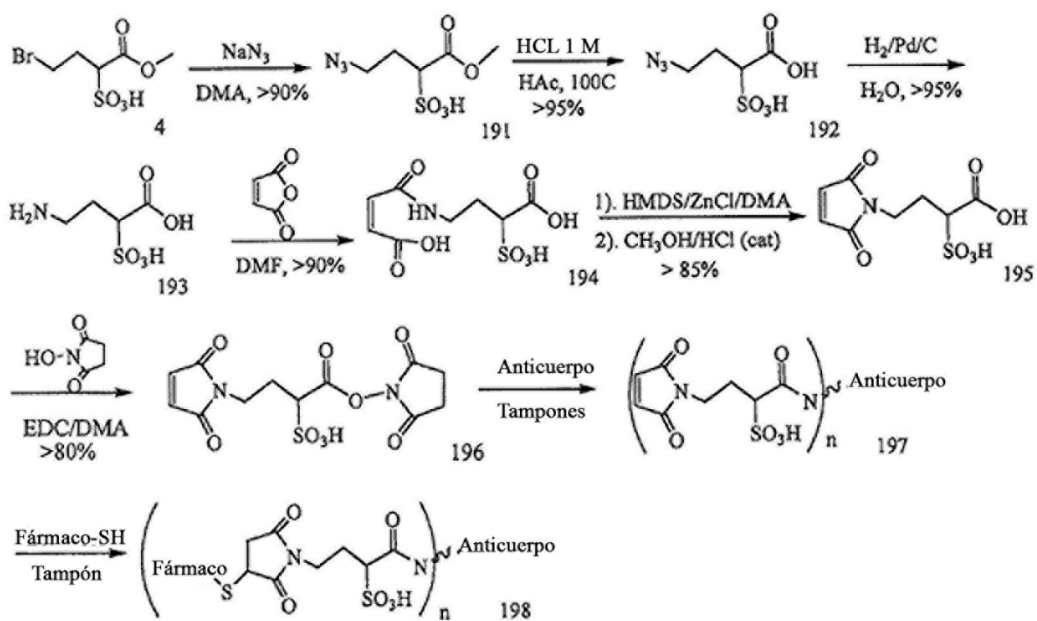


FIG. 68

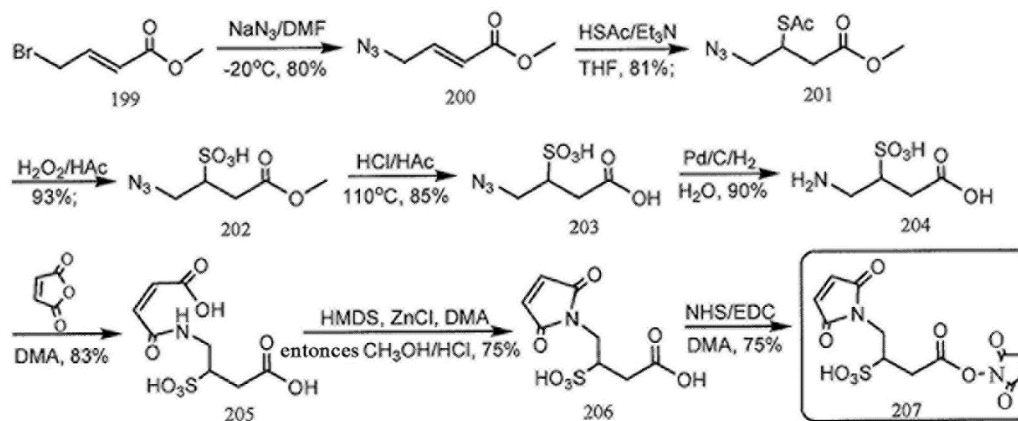
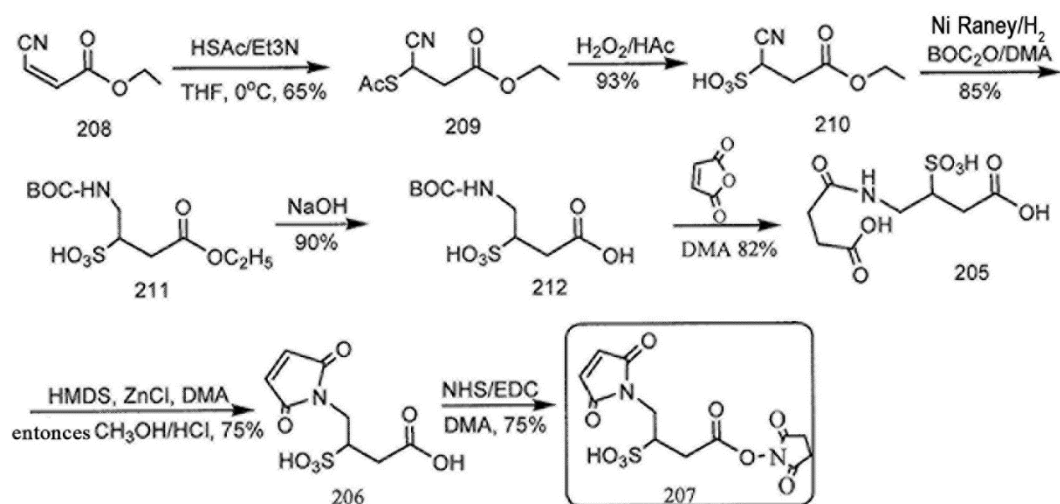
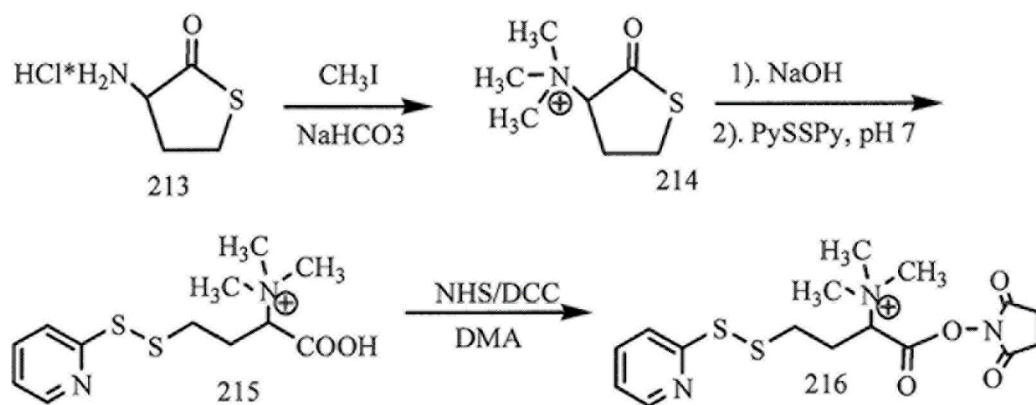
Figura 69**Figura 70**

Figura 71

FIGURAS 72(A) y (B) Farmacocinética plasmática de conjugados de anticuerpo huC242-sulfo-Mal-DM4 [marcado con ^3H] con 3,5 DM4/Ac o 6,4 DM4/Ac dosificados a 12,9 mg/kg y 7,9 mg/kg (iv) respectivamente en ratones CD-1. A. Concentraciones de Ac (medidas por ELISA o recuentos de ^3H) frente al tiempo después de la administración. B. Relación de maitansinoide (DM4)/anticuerpo (Ac) frente al tiempo después de la administración

FIGURA 72(A)

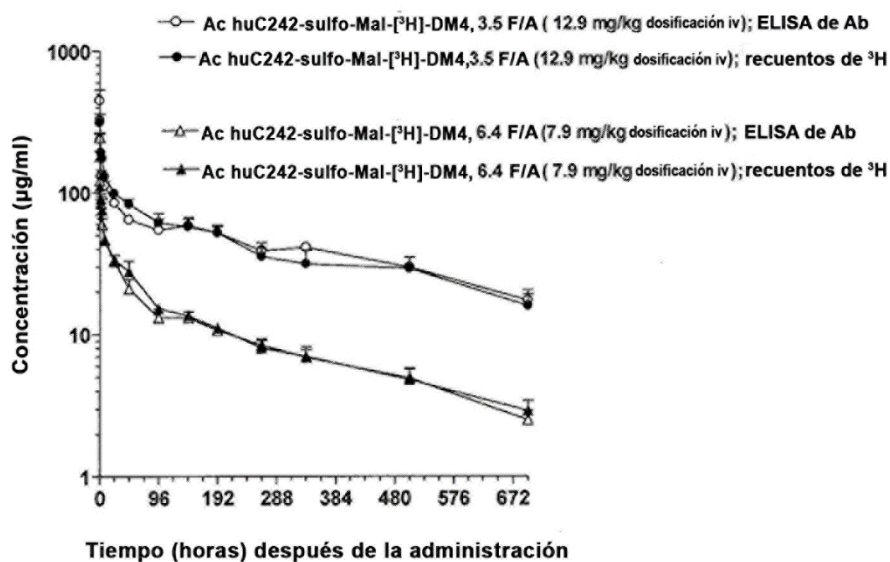


FIGURA 72 (B)