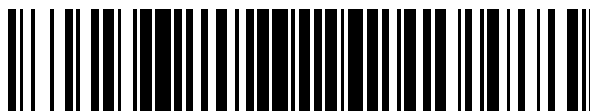


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 233**

51 Int. Cl.:

A01N 43/62 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/US2012/059870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12840422 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2753178**

54 Título: **Pirrolobenzodiazepinas y conjugados dirigidos**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547195 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2018

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (50.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US y
MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

JEFFREY, SCOTT;
BURKE, PATRICK y
HOWARD, PHILIP, WILSON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 660 233 T3

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

DESCRIPCIÓN

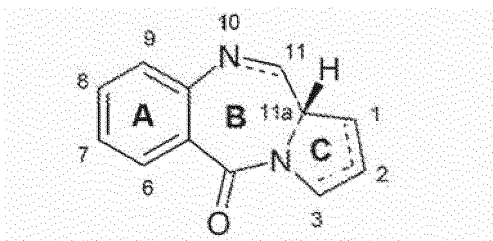
Pirrolobenzodiazepinas y conjugados dirigidos

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular dímeros de pirrolobenzodiazepina que tienen un doble enlace C2-C3 y un grupo arilo en la posición C2 en cada unidad monomérica, y su inclusión en conjugados dirigidos.

Antecedentes de la invención

- 10 Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBD) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferente es PuGPu. El primer antibiótico antitumor de PBD, antramycin, se descubrió en 1965 (Leimgruber, y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se han presentado un número de PBD de origen natural, y se han desarrollado numerosas
- 15 vías sintéticas para una diversidad de análogos (Thurston, y col., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston. DE, Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Los miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski, y col., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, y col., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Patente Japonesa 58-180 487; Thurston, y col., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, y col., tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, y col., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, y col., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), protramicina (Tsunakawa, y col., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, y col., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, y col., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); ttoh, y col., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, y col., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, y col., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Las PBD son de la estructura general:

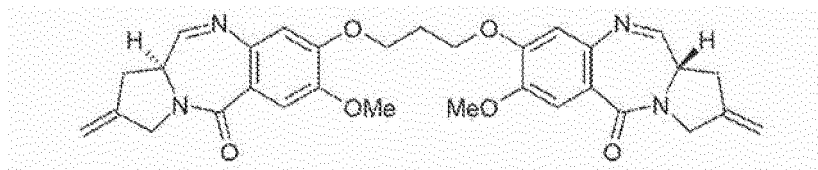
25



- 30 Se diferencian en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como en los anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un metil éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de alquilar el ADN. Todos los productos naturales conocidos tiene una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro a la derecha cuando se ven desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional adecuada para la isohelicidad con el surco menor del ADN de la forma B, lo que conduce a un ajuste ceñido en el sitio de unión (Kohn, In Antibiotics III, Springer-Verlag, Nueva York, pág 3-11 (1975); Hurley y
- 35 Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor, les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

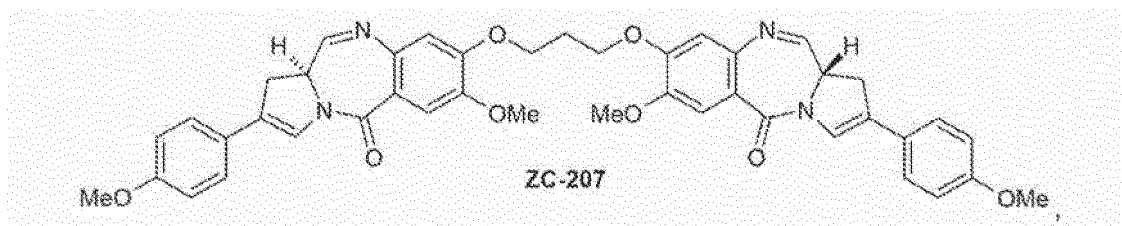
- 40 Se ha desvelado previamente que la actividad biológica de estas moléculas se puede potenciar uniendo dos unidades PBD juntas a través de sus funcionalidades C8/C'-hidroxilo a través de un enlazador de alqueno flexible (Bose, DS, y col., J. Am. Chem. Soc., 114, 4933-4941 (1992); Thurston, DE, y col., J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996)). Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones de ADN de secuencia selectiva tal como el enlace cruzado interstrand 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómico (Smellie, M., y col., Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., y col., Biochemistry, 44, 4135-4147) que se cree que es el principal responsable de su actividad biológica. Un ejemplo de un dímero de PBD, SG2000 (SJG-136):

45

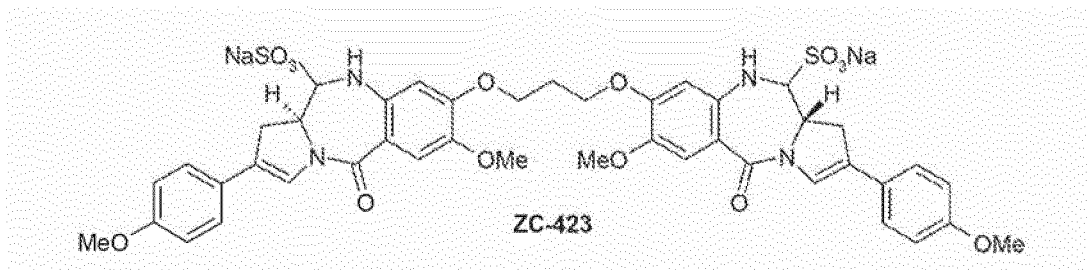


- 50 ha entrado recientemente en ensayos clínicos de fase II en el área de oncología (Gregson, S., y col., J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, MC, y col., Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, JA, y col., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)).

Más recientemente, los presentes inventores han desvelado previamente en el documento WO 2005/085251, compuestos de PBD dímeros que portan sustituyentes arilo C2, tales como SG2202 (ZC-207):



y en el documento WO2006/111759, bisulfitos de dichos compuestos de PBD, por ejemplo SG2285 (ZC-423):



5

Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos altamente útiles (Howard, PW, y col., Bioorg. Med. Chem. (2009), 19 (22), 6463-6466, doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

10 Debido a la forma en que estos compuestos altamente potentes actúan en la reticulación del ADN, estas moléculas se han fabricado simétricamente. Esto proporciona una síntesis directa, construyendo los restos de PBD simultáneamente que ya han formado el enlace del dímero, o haciendo reaccionar restos de PBD ya construidos con el grupo de unión del dímero.

15 El documento WO 2010/043880 desvela un compuesto de PBD dímero que porta grupos arilo en la posición C2 de cada monómero, en la que uno de estos grupos arilo porta un sustituyente diseñado para proporcionar un anclaje para unir el compuesto a otro resto. La Solicitud Internacional PCT/US2011/032664, en trámite junto con la pendiente, presentada el 15 de abril de 2011, desvela la inclusión de estos compuestos dímeros de PBD en conjugados dirigidos.

20

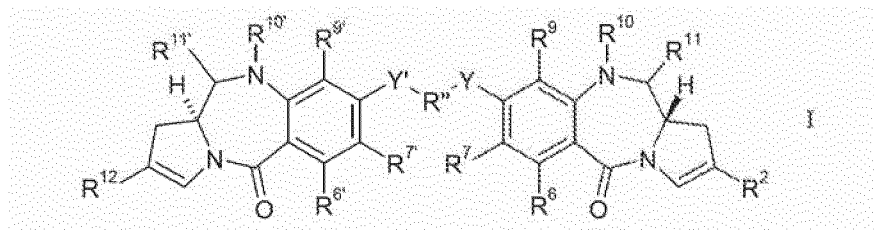
Divulgación de la invención

Los presentes inventores han desarrollado compuestos de PBD dímeros no asimétricos adicionales para su inclusión en conjugados dirigidos, en donde los sustituyentes en el grupo arilo C2 que no portan el anclaje para unir el compuesto a otro resto son diferentes de los descritos previamente. Estos grupos sustituyentes diferentes pueden ofrecer ventajas en la preparación y el uso de los compuestos, particularmente en sus propiedades biológicas y la síntesis de conjugados, y las propiedades biológicas de estos conjugados.

25

La presente invención comprende un compuesto con la fórmula I:

30



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

35 R^2 es de fórmula III:



40 en la que A es un grupo fenilo,
y

Q^2 se selecciona entre un enlace sencillo y $-CH_2-$;

R^{12} es fenilo, sustituido con un grupo seleccionado entre OH, CO_2H y CO_2Me ;

5 R^6 y R^9 son H;

R^7 es un alquilo C_{1-4}
y:

10 (a) R^{10} es H, y R^{11} es OH, OR^A , en la que R^A es alquilo C_{1-4} ; o
(b) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos;

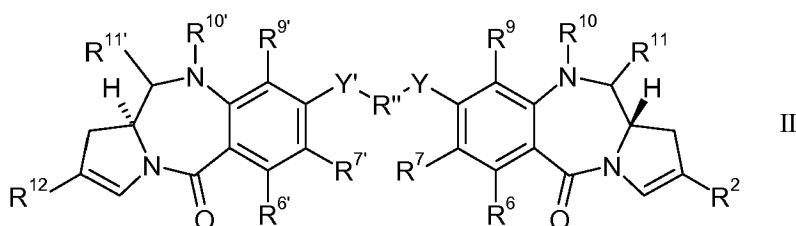
15 R'' es un grupo alquileo C_{3-7} ;

Y e Y' son O;

20 R^6 , R^7 , R^9 se seleccionan entre los mismos grupos que R^6 , R^7 y R^9 respectivamente y R^{10} y R^{11} son iguales que R^{10} y R^{11} , en la que el término alquilo incluye las subclases alqueno, alquino y cicloalquilo, y el término alquileo incluye las subclases alqueno, alquino y cicloalquilo.

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

25 Un segundo aspecto de la presente invención comprende un compuesto de fórmula II:



30 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que:

R^2 es de fórmula III:



35 en la que A es un grupo fenilo;

Q^2 se selecciona entre un enlace sencillo y $-CH_2-$;

40 R^{12} es fenilo, sustituido con un grupo seleccionado entre OH, CO_2H y CO_2Me ;

R^6 y R^9 son H; R^7 es un alquilo C_{1-4} ;
y:

45 (a) R^{10} es 2,2,2-tricloretoxicarbonilo y R^{11} es O-terc-butildimetilsililo o
(b) R^{10} es [2-(trimetilsilil)etoxi]metilo y R^{11} es un grupo oxo;

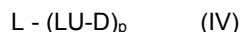
R'' es un grupo alquileo C_{3-7} ;

50 Y e Y' son O;

R^6 , R^7 , R^9 se seleccionan entre los mismos grupos que R^6 , R^7 y R^9 respectivamente y R^{10} y R^{11} son iguales que R^{10} y R^{11} .

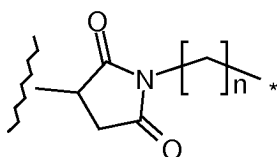
55 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden dímeros de PBD unidas a un agente de dirección, en la que el dímero de PBD es de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma (mencionada anteriormente).

En algunas realizaciones, los conjugados tienen la siguiente fórmula IV:

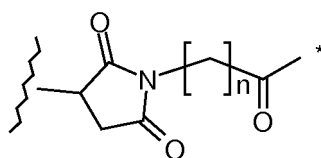


5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que L es una unidad de ligando (es decir, un agente de dirección), LU es una unidad de enlazador y D es una unidad de fármaco que es un dímero de PBD (véase a continuación). El subíndice p es de 1 a 20. Por consiguiente, los conjugados comprenden una unidad de ligando covalentemente unida a al menos una unidad de fármaco mediante una unidad de enlazador. La unidad de ligando, descrita con más detalle a continuación, es un agente de dirección que se une a un resto diana. La unidad de ligando puede, por ejemplo, unirse específicamente a un componente celular (un agente de unión a célula) o a otras moléculas diana de interés. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un conjugado para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o de una enfermedad autoinmune.

15 La unidad de enlazador es $-A^1-L^1-$, en la que A^1 se selecciona entre:

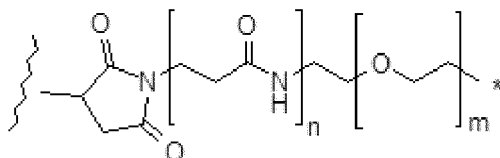


en la que n es 0 a 6;



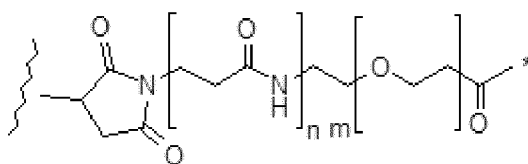
20

en la que n es 0 a 6;



25

en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30 o



30

en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30,
 L^1 comprende una secuencia de aminoácido que es escindible mediante la acción de una enzima y en la que en los grupos A^1 anteriores, el asterisco indica el punto de unión a L^1 y la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando.

35 La unidad de ligando se selecciona entre un anticuerpo, y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo.

En los conjugados de la presente invención, El dímero D de PBD es de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, conectado a la unidad de enlazador a través del sustituyente amino de R^2 en D como se define en el presente documento.

40

La carga del fármaco está representada por p, el número de moléculas de fármaco por unidad de ligando (p. ej., un anticuerpo). La carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 20 unidades de fármaco (D) por unidad de ligando (p. ej., Ab o mAb). Para las composiciones, p representa la carga promedio de fármaco de los conjugados en la composición y p oscila entre 1 y 20.

45

En algunas realizaciones, p es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones, p es 1. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es de

aproximadamente 2 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, 2 a aproximadamente 5, o 2 a aproximadamente 4 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando.

5 El número promedio de unidades de fármacos por unidad de ligando en una preparación a partir de una reacción de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo de ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de conjugados en términos de p también puede ser determinada. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados homogéneos, donde p es un determinado
10 valor, a partir de conjugados con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a compuestos de enlazador-fármaco (es decir, enlazadores de fármaco) que comprenden dímeros de PBD (véase anteriormente) unidos a una unidad de enlace. Estos enlazadores de fármaco pueden usarse como intermedios para la síntesis de conjugados que comprenden dímeros de PBD unidos a un agente de dirección.

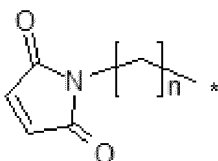
Estos enlazadores de fármaco tienen la siguiente fórmula V:



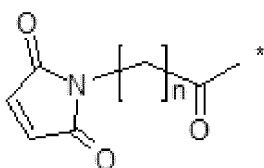
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que LU es una unidad de enlazador y D es una unidad de fármaco que es un dímero de PBD.

25 En los enlazadores de fármaco de la presente invención, El dímero D de PBD es de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, conectado a la unidad de enlazador a través del sustituyente amino de R² en D como se define en el presente documento.

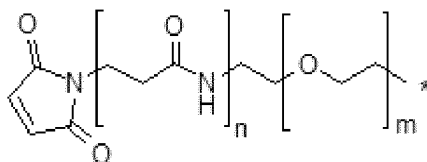
30 La unidad de enlazador es G¹-L¹, en la que L¹ comprende una secuencia de aminoácido que es escindible mediante la acción de una enzima, y G¹ se selecciona entre:



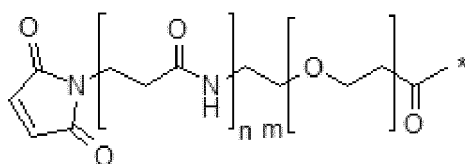
35 en la que n es 0 a 6;



en la que n es 0 a 6;



40 en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30;



45 en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30 y en la que en los grupos G¹ anteriores, el asterisco indica el punto de unión a L¹.

Figuras

La Fig. 1 muestra el efecto sobre el volumen tumoral de un conjugado de la presente invención en dos dosis diferentes;

5 La Fig. 2 muestra el efecto sobre el volumen tumoral del mismo conjugado que en la Figura 1 en un tumor diferente.

Definiciones10 *Cationes farmacéuticamente aceptables*

Ejemplos de cationes monovalentes y divalentes farmacéuticamente aceptables se tratan en Berge, y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines.

15 El catión farmacéuticamente aceptable puede ser inorgánico u orgánico.

Ejemplos de cationes monovalentes inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, iones de metal alcalino tales como Na^+ y K^+ . Ejemplos de cationes divalentes inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Ejemplos de cationes orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, ión amonio (es decir NH_4^+) e iones de amonio sustituido (p. ej., NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son los procedentes de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión de amonio cuaternario común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Sustituyentes

La expresión «opcionalmente sustituido», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo principal que puede estar no sustituido o que puede estar sustituido.

A menos que se especifique otra cosa, el término «sustituido», tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo principal que porta uno o más sustituyentes. El término «sustituyente» se usa en el presente documento en el sentido convencional y se refiere a un resto químico que está covalentemente unido o, si es adecuado, fusionado a un grupo principal. Se conocen bien una amplia diversidad de sustituyentes, y también son bien conocidos los métodos para su formación e introducción en una diversidad de grupos principales.

Ejemplos de sustituyentes se describen con más detalle a continuación.

40 El término «alquilo C_{1-4} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, y que puede ser saturado o insaturado (p. ej., parcialmente insaturado, completamente insaturado). De manera similar, el término «alquilo C_{1-2} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 2 átomos de carbono, es decir metilo o etilo.

Por tanto, el término «alquilo» incluye las subclases alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, etc., tratadas a continuación.

50 Ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C_1), etilo (C_2), propilo (C_3), butilo (C_4), pentilo (C_5), hexilo (C_6) y heptilo (C_7).

Ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C_1), etilo (C_2), n-propilo (C_3), n-butilo (C_4), n-pentilo (amilo) (C_5), n-hexilo (C_6) y n-heptilo (C_7).

55 Ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C_3), iso-butilo (C_4), sec-butilo (C_4), terc-butilo (C_4), iso-pentilo (C_5) y neo-pentilo (C_5).

60 Alquenoilo C_{2-12} : El término «alquenoilo C_{2-12} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

Ejemplos de grupos alquenoilo insaturados incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1-propenilo ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-propenilo (alilo, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$), isopropenilo (1-metilvinilo, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$), butenilo (C_4), pentenilo (C_5) y hexenilo (C_6).

65 Alquinoilo C_{2-12} : El término «alquinoilo C_{2-12} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo

que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono.

Ejemplos de grupos alquino insaturados incluyen, pero sin limitación, etinilo ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y 2-propinilo (propargilo, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$).

5 Cicloalquilo C_{3-12} : El término «cicloalquilo C_{3-12} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que también es un grupo ciclico; es decir, un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo alicíclico de un compuesto de hidrocarburo cíclico (carbocíclico), cuyo resto tiene de 3 a 7 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 7 átomos en el anillo.

10 Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, los procedentes de:

compuestos de hidrocarburos monocíclicos saturados:

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

compuestos de hidrocarburo monocíclico insaturado:

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

25 compuestos de hidrocarburo policíclico saturado: norcarano (C_7), norpinano (C_7), norbornano (C_7).

Alcoxi: $-\text{OR}$, en el que R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos alcoxi C_{1-7} incluyen, pero sin limitación, $-\text{OMe}$ (metoxi), $-\text{OEt}$ (etoxi), $-\text{O}(\text{nPr})$ (n-propoxi), $-\text{O}(\text{iPr})$ (isopropoxi), $-\text{O}(\text{nBu})$ (n-butoxi), $-\text{O}(\text{sBu})$ (sec-butoxi), $-\text{O}(\text{iBu})$ (isobutoxi) y $-\text{O}(\text{tBu})$ (terc-butoxi).

30 *Alquileno*

Alquileno C_{3-12} : El término «alquileno C_{3-12} », tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto bidentado obtenido mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o uno de cada uno de los dos átomos de carbono diferentes de un compuesto hidrocarburo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se indique otra cosa), que puede ser alifático o alicíclico y que puede ser saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado. Por tanto, el término «alquileno» incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquileno, etc., tratadas a continuación.

40 Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} lineales saturados incluyen, pero sin limitación, $-(\text{CH}_2)_n-$ en el que n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (propileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (butileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (pentileno) y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (heptileno).

45 Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} ramificados saturados incluyen, pero sin limitación, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

50 Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} lineales parcialmente insaturados (grupos alquenileno y alquinileno C_{3-12}) incluyen, pero sin limitación, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ y $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$.

55 Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} ramificados parcialmente insaturados (grupos alquenileno y alquinileno C_{3-12}) incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ y $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$.

Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} alicíclicos saturados (cicloalquilenos C_{3-12}) incluyen, pero sin limitación, ciclopropileno (p. ej., cicloprop-1,3-ileno) y ciclohexileno (p. ej., ciclohex-1,4-ileno).

60 Ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} alicíclicos parcialmente insaturados (cicloalquilenos C_{3-12}) incluyen, pero sin limitación, ciclopropenileno (p. ej., 4-ciclopropen-1,3-ileno), ciclohexenileno (p. ej., 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

Conjugados

65 La presente invención proporciona conjugados que comprenden un dímero de PBD conectado a una unidad de ligando a través de una unidad de enlazador.

Preferencias

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención como se describió anteriormente, o pueden referirse a un único aspecto. Las preferencias se pueden combinar juntas en cualquier combinación.

5 Cuando la unidad de especificidad L^1 es escindible, la estructura y/o secuencia de L^1 se selecciona de tal manera que se escinda mediante la acción de las enzimas presentes en el sitio diana (p. ej., la célula diana).

10 L^1 puede comprender un aminoácido o una secuencia contigua de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos puede ser el sustrato diana para una enzima.

L^1 es escindible mediante la acción de una enzima. La enzima puede ser una estereasa o una peptidasa. Por ejemplo, L^1 se puede escindir mediante una proteasa lisosomal, tal como una catepsina.

15 En una realización, L^1 comprende un dipéptido. Los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil de catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por la catepsina. El dipéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina.

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

- Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- 25 - Ala-Lis-,
- Val-Cit-,
- Fe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Iso-Cit-,
- 30 - Fe-Arg- y
- Trip-Cit-;

en donde Cit is citrulina. En dicho péptido, $-NH-$ es el grupo amino de X_1 , y CO es el grupo carbonilo de X_2 .

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

- Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- 40 - Ala-Lis- y
- Val-Cit-.

Lo más preferente, el grupo $-X_1-X_2-$ en el dipéptido, $-NH-X_1-X_2-CO-$, es $-Fe-Lis-$, $Val-Cit$ o $-Val-Ala-$.

45 Otras combinaciones de dipéptidos de interés incluyen:

- Gli-Gli-,
- Pro-Pro- y
- Val-Glu-.

50 Se pueden usar otras combinaciones de dipéptidos, incluyendo las descritas por Dubowchik y col.,

En una realización, la cadena lateral de aminoácido está químicamente protegida, cuando sea adecuado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo como se trata a continuación. Las secuencias de aminoácidos protegidas son escindibles por enzimas. Por ejemplo, una secuencia dipeptídica que comprende un residuo de Lis protegido con cadena lateral Boc es escindible mediante la catepsina.

60 Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se describen en el catálogo de Novabiochem. Las estrategias adicionales del grupo protector se establecen en grupos protectores en Organic Synthesis, Greene y Wuts.

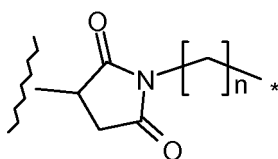
Los posibles grupos protectores de cadena lateral se muestran a continuación para aquellos aminoácidos que tienen funcionalidad de cadena lateral reactiva:

65 Arg: Z, Mtr, Tos;
Asp: Trt, Xan;

- Asp: Bzl, t-Bu;
 Cis: AcM, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
 Glu: Bzl, t-Bu;
 Gln: Trt, Xan;
 5 His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
 Lis: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z;
 Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
 Tre: Bz;
 Trp: Boc;
 10 Tir: Bzl, Z, Z-Br.

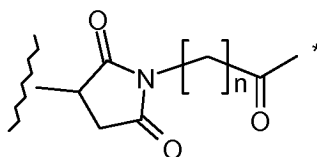
En una realización, $-X_1-$ está conectado directamente a A^1 . Preferentemente el grupo $NH-X_1-$ (el extremo amino de X_1) está conectado a A^1 . A^1 puede comprender la funcionalidad $-CO-$ para formar así un enlace amida con $-X_1-$.

- 15 En una realización, el grupo A^1 es:



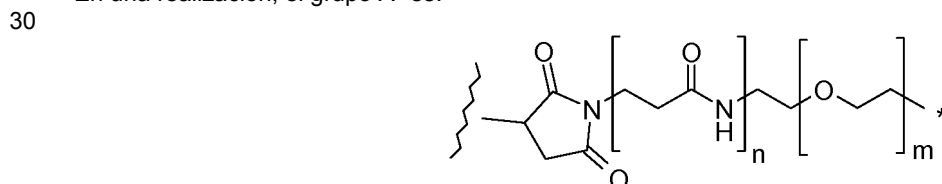
- 20 en la que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo A^1 es:



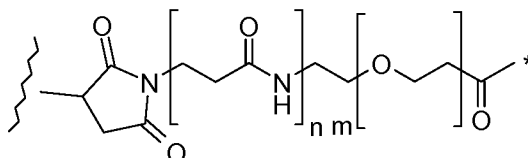
- 25 en la que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo A^1 es:



- 35 en la que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

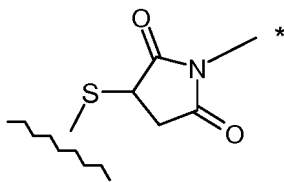
En una realización, el grupo A^1 es:



- 40 en la que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

- 45 En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y A^1 es a través de un residuo tiol de la unidad de ligando y un grupo maleimida de A^1 .

En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y A¹ es:



5 en la que el asterisco indica el punto de unión a la porción restante de A¹ o L¹ y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante de la unidad de ligando. En la presente realización, el átomo de S normalmente procede de la unidad de ligando.

10 En una realización, L¹ comprende un dipéptido y un extremo del dipéptido se une a D. Como se describió anteriormente, los aminoácidos en el dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil de catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por la catepsina. El dipéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina.

15 En una realización, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, se selecciona entre:

- Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- 20 - Ala-Lis-,
- Val-Cit-,
- Fe-Cit-,
- Leu-Cit-, -Iso-Cit-,
- Fe-Arg- y
- 25 - Trip-Cit-;

en donde Cit is citrulina. En dicho péptido, -NH- es el grupo amino de X₁, y CO es el grupo carbonilo de X₂.

Preferentemente, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, se selecciona entre:

- 30 - Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- Ala-Lis- y
- 35 - Val-Cit-.

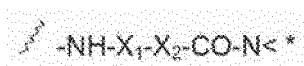
Lo más preferente, el grupo -X₁-X₂- en el dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, es -Fe-Lis- o -Val-Ala-.

Otras combinaciones de dipéptidos de interés incluyen:

- 40 - Gli-Gli-,
- Pro-Pro- y
- Val-Glu-.

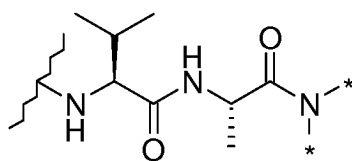
45 Se pueden usar otras combinaciones de dipéptidos, incluyendo las descritas anteriormente.

En una realización, L¹-D es:



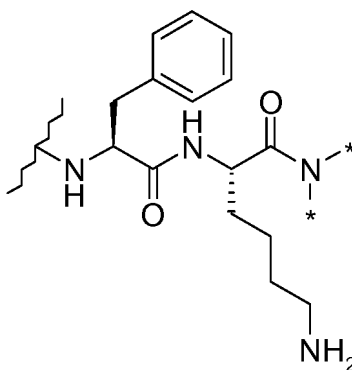
50 en la que -NH-X₁-X₂-CO es el dipéptido, -N< es parte de la unidad de fármaco, el asterisco indica los puntos de unión al resto de la unidad de fármaco, y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante de L¹ o el punto de unión a A¹. Preferentemente, la línea ondulada indica el punto de unión a A¹.

55 En una realización, el dipéptido es valina-alanina y L¹-D es:



en la que los asteriscos, -N< y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

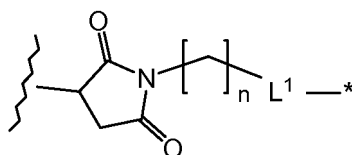
- 5 En una realización, el dipéptido es fenilalanina-lisina y L¹-D es:



en la que los asteriscos, -N< y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

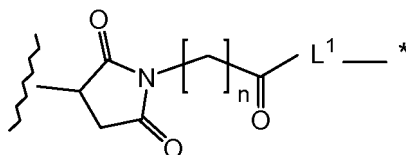
- 10 En una realización, el dipéptido es valina-citrulina.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



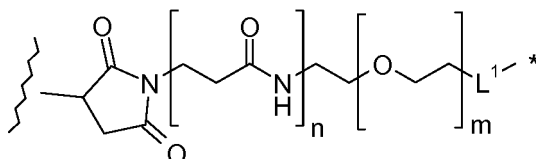
- 15 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

- 20 En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



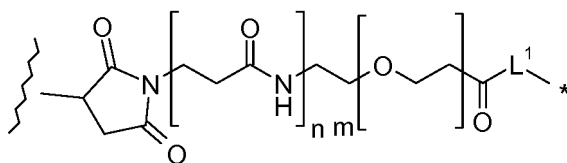
- 25 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



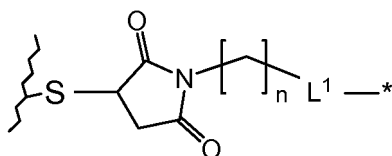
- 30 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

- 35 En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



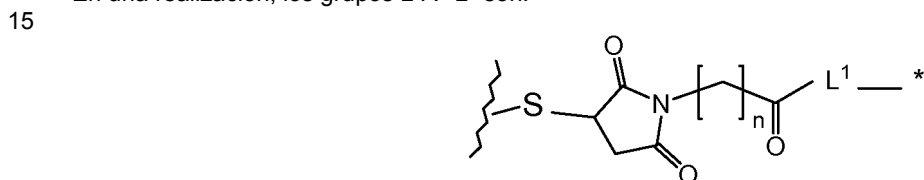
5 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 7, preferentemente 3 a 7, lo más preferente 3 u 7.

En una realización, los grupos $L-A^1-L^1$ son:



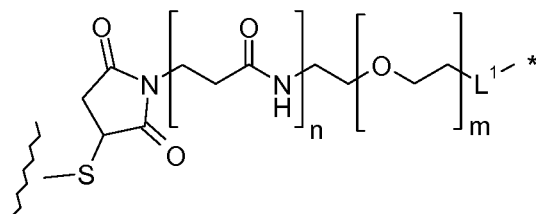
10 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo de azufre de la unidad de ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos $L-A^1-L^1$ son:



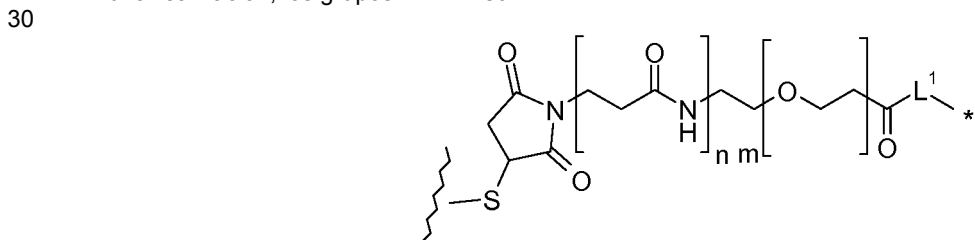
20 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo de azufre de la unidad de ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos $L-A^1-L^1$ son:



25 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, S es un grupo de azufre de la unidad de ligando, la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

En una realización, los grupos $L-A^1-L^1$ son:



35 en donde el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 7, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

Enlazador- fármacos

5 En otras realizaciones, los compuestos de enlazador-fármaco se proporcionan para la conjugación a una unidad de ligando. En una realización, los compuestos de enlazador-fármaco están diseñados para la conexión a un agente de unión a célula.

10 En una realización, en la que L^1 comprende un aminoácido, la cadena lateral de ese aminoácido puede estar protegida. Se puede usar cualquier grupo protector adecuado. En una realización, los grupos protectores de la cadena lateral se extraen con otros grupos protectores en el compuesto, en caso de estar presentes. En otras realizaciones, los grupos protectores pueden ser ortogonales a otros grupos protectores en la molécula, en caso de estar presentes.

15 Los grupos protectores adecuados para las cadenas laterales de aminoácidos incluyen los grupos descritos en el catálogo de Novabiochem 2006/2007. Los grupos protectores para su uso en un enlazador lábil de catepsina también se tratan en Dubowchik y col.,

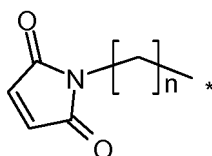
20 En determinadas realizaciones de la invención, el grupo L^1 incluye un resto de aminoácido lisina. La cadena lateral de este aminoácido puede estar protegida con un grupo protegido con Boc o Alloc. Un grupo protector Boc es lo más preferente.

El grupo funcional G^1 forma un grupo de conexión tras la reacción con una unidad de ligando (p. ej., un agente de unión celular.

G^1 comprende un grupo maleimida.

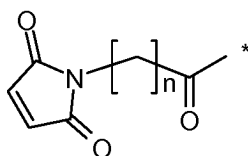
25 En una realización, el grupo G^1 es un grupo alquilo de maleimida. Este grupo es adecuado para la reacción con grupos tiol, particularmente grupos tiol de cisteína, presente en el agente de unión celular, por ejemplo presente en un anticuerpo.

30 En una realización, el grupo G^1 es:



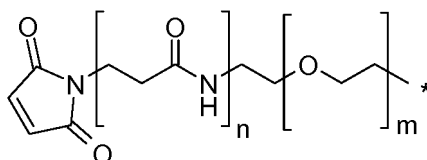
35 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo G^1 es:



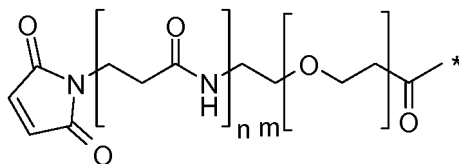
40 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, el grupo G^1 es:



45 en el que el asterisco indica el punto de unión a L^1 , n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 2, preferentemente 4 a 8, y lo más preferentemente 4 u 8.

En una realización, el grupo G¹ es:



- 5 en el que el asterisco indica el punto de unión a L¹, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferente, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, y lo más preferentemente 4 u 8.

Unidad de ligando

- 10 La unidad de ligando se une específicamente a una molécula diana y puede ser un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión a la molécula diana.

La unidad de ligando también se denomina en el presente documento «agente de unión» o «agente de dirección»

- 15 Los términos «se une específicamente» y «unión específica» se refieren a la unión de un anticuerpo u otra proteína, polipéptido o péptido a una molécula predeterminada (p. ej., un antígeno). Normalmente, el anticuerpo u otra molécula se une con una afinidad de al menos aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y se une a la molécula predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a una molécula no específica (p. ej. ASB, caseína) distinta de la molécula predeterminada o una molécula estrechamente relacionada.

- 20 Ejemplos de unidades de ligando incluyen los agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines.

- 25 En algunas realizaciones, la unidad de ligando es un agente de unión a célula que se une a un objetivo extracelular en una célula. Dicho agente de unión celular puede ser una proteína, un polipéptido, un péptido o un agente no peptídico. En algunas realizaciones, el agente de unión a célula puede ser una proteína, un polipéptido o un péptido. En algunas realizaciones, el agente de unión a célula puede ser un polipéptido cíclico. El agente de unión a célula también puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF).

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

- 35 El anticuerpo puede ser un diacuerpo, un anticuerpo de dominio (ACD) o un anticuerpo monocatenario.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

- 40 Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los anticuerpos descritos en el documento WO 2005/082023 que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines. Son particularmente preferentes los anticuerpos para antígenos asociados a tumores. Ejemplos de esos antígenos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, los antígenos asociados a tumores establecidos en el documento WO 2005/082023. Véase, por ejemplo, las páginas 41-55.

- 45 En algunas realizaciones, los conjugados están diseñados para dirigirse a células tumorales a través de sus antígenos de superficie celular. Los antígenos pueden ser antígenos de superficie celular que están sobreexpresados o expresados en tiempos anormales o tipos de células. Preferentemente, el antígeno diana se expresa solo en células proliferativas (preferentemente células tumorales); sin embargo, esto rara vez se observa en la práctica. Como resultado, los antígenos diana normalmente se seleccionan sobre la base de la expresión diferencial entre tejido proliferativo y sano.

Los anticuerpos se han aumentado para dirigirse a antígenos específicos relacionados con tumores, que incluyen:

- 55 Cripto, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, Glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD70, CD79, CD138, PSCA, PSMA (antígeno prostático específico de membrana), BCMA, E-selectina, EphB2, melanotransferina, Muc16 y TMEFF2. En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, la unidad de ligando puede ser un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno Cripto, al antígeno CD19, al antígeno CD20, al antígeno CD22, al antígeno CD30, al antígeno CD33, a la glicoproteína NMB, al antígeno CanAg, al antígeno Her2 (ErbB2/Neu), al antígeno CD56 (NCAM), al antígeno CD70, al antígeno CD79, al antígeno CD138, al PSCA, al PSMA (antígeno prostático específico de membrana),

al BCMA, a la E-selectina, a la EphB2, a la melanotransferina, al antígeno Muc16 o al antígeno TMEFF2.

La unidad de ligando está conectada a la unidad de enlazador. En una realización, la unidad de ligando está conectado a A, cuando está presente, de la unidad de enlazador.

5 En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y la unidad de enlazador es a través de un enlace tioéter.
En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y la unidad de enlazador es a través de un enlace disulfuro.

10 En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y la unidad de enlazador es a través de un enlace amida.
En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y la unidad de enlazador es a través de un enlace éster.

En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y el enlazador se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína de la unidad de ligando y un grupo maleimida de la unidad de enlazador.

15 Los restos de cisteína de la unidad de ligando pueden estar disponibles para la reacción con el grupo funcional de la unidad de enlazador para formar una conexión. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando la unidad de ligando es un anticuerpo, los grupos tiol del anticuerpo pueden participar en enlaces disulfuro intercatenarios. Estos enlaces intercatenarios se pueden convertir en grupos tiol libres, p. ej., mediante el tratamiento del anticuerpo con DTT antes de la reacción con el grupo funcional de la unidad del enlazador.

20 En algunas realizaciones, el resto de cisteína se introduce en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Las posiciones para la inserción de cisteína por sustitución en cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos incluyen las descritas en la Solicitud Publicada de EE.UU. n.º 2007-0092940 y la publicación de la Patente Internacional WO2008/070593, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad y para todos los fines.

25 Métodos de tratamiento

Los compuestos o conjugados de la presente invención se pueden usar en un método de terapia. Dicho método de tratamiento puede comprender administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o conjugado del mismo. El término «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad suficiente para mostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej., las decisiones sobre la dosificación, es de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos.

35 Un compuesto o conjugado se puede administrar solo o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero sin limitación, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, p. ej., fármacos); cirugía y radioterapia.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un compuesto de fórmula I, o un conjugado del mismo, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizador farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, p. ej., cutánea, subcutánea o intravenosa.

50 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina.

55 Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica pueden preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

60 Los compuestos y conjugados pueden usarse para tratar una enfermedad proliferativa y una enfermedad autoinmune. El término «enfermedad proliferativa» se refiere a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseada, tal como, crecimiento neoplásico o hiperplásico, *in vitro* o *in vivo*.

65 Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero sin limitación, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluyendo, pero sin limitación, neoplasmas y tumores (p. ej., histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma),

cánceres (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (p. ej., de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, pero sin limitación, malignidades hematológicas; tales como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkin, y subtipos tales como LDCGB, zona marginal, zona del manto y folículo, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen de células B o T.

Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen las siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielinizantes autoinmunes (p. ej., esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), artritis psoriásica, oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn), anafilaxis, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conectivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrosante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis crónica activa autoinmune, pulmón del cuidador de aves, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis del endomiocardio, endoftalmítis, eritema elevado y diutino, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto frente a huésped, rechazo de trasplantes, miocardiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome de Evan, y falla gonadal autoinmune.

En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune es un trastorno de los linfocitos B (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), linfocitos Th1 (p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto frente a huésped) o linfocitos Th2 (p. ej., dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, o enfermedad crónica de injerto frente a huésped). Generalmente, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th1 o linfocitos Th2. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmune es un trastorno inmunológico mediado por células T.

En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 mg/kg por dosis.

55 Incluye otras formas

A menos que se indique otra cosa, se incluyen en lo anterior las formas iónicas, salinas, solvatos y protegidas bien conocidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia al ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma (carboxilato) aniónica (-COO), una sal o solvato de la misma, así como las formas protegidas convencionales. De manera similar, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-N+HR¹R²), una sal o un solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal de hidrocioruro, así como las formas protegidas convencionales de un grupo amino. De manera similar, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma aniónica (-O⁻), una sal o un solvato de la misma, así como las formas protegidas convencionales.

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se tratan en Berge, y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (p. ej., -COOH puede ser -COO⁻), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metal alcalino tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes tales como Al³⁺. Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ión amonio (es decir NH₄⁺) e iones de amonio sustituidos (p. ej., NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son los procedentes de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (p. ej., -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los procedentes de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

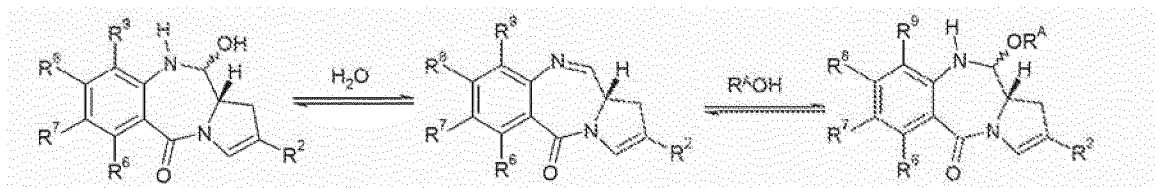
Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los procedentes de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetioxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, los procedentes de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

30 Solvatos

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

Carbinolaminas

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



Estas formas se pueden llamar las formas de carbinolamina y éter de carbinolamina de la PBD. El resto de estos equilibrios depende de las condiciones en las que se encuentran los compuestos, así como de la naturaleza del resto en sí.

Estos compuestos especiales se pueden aislar en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

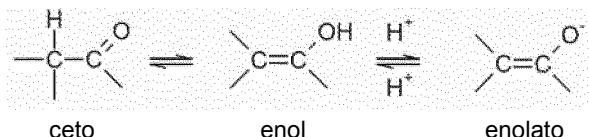
50 Isómeros

Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas especiales, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, que incluyen, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c-, t- y r-; formas endo y exo; formas R-, S- y meso; formas D- y L; formas d- y l; formas (+) y (-); formas ceto-, enol- y enolato; syn- y anti-formas; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β; formas axiales y ecuatoriales; formas barco-, silla-, torsión, sobre-, y media silla y combinaciones de las mismas, en lo sucesivo colectivamente denominadas «isómeros» (o «forma isomérica»).

Tenga en cuenta que, excepto como se trata a continuación para formas tautómeras, específicamente excluidas del término «isómeros», tal como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es

decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De manera similar, una referencia al orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas que pertenecen a esa clase (p. ej., alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

- 5
- 10 La exclusión anterior no concierne a formas tautoméricas, por ejemplo, formas ceto-, enol- y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitrolo/hidroxiatio y nitro/aci-nitro.



- 15 Tenga en cuenta que se incluyen específicamente en el término «isómero» los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹H, ²H (D) y ³H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹²C, ¹³C y ¹⁴C; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ¹⁶O y ¹⁸O; y similares.

- 20 A menos que se indique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluye todas las formas isoméricas, incluyendo (total o parcialmente) racémicas y otras mezclas de las mismas. Los métodos de preparación (p. ej., síntesis asimétrica) y separación (p. ej., cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de dichas formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento, o los métodos conocidos, de una manera conocida.

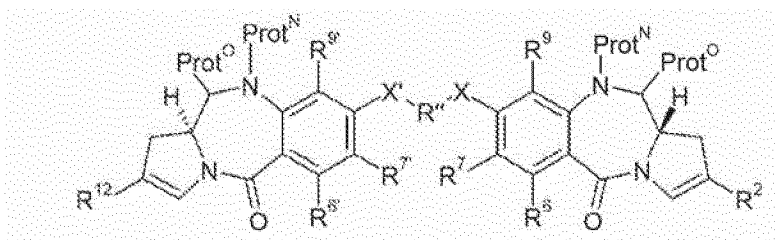
25 Vías de síntesis generales

La síntesis de los compuestos de PBD se trata extensamente en las siguientes referencias,

- 30 a) documento WO 00/12508 (páginas 14 a 30);
 b) documento WO 2005/023814 (páginas 3 a 10);
 c) documento WO 2004/043963 (páginas 28 a 29) y
 d) documento WO 2005/085251 (páginas 30 a 39).

35 *Vía de síntesis*

Los compuestos de la presente invención, en donde R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que están unidos, pueden sintetizarse a partir de un compuesto de Fórmula 2:

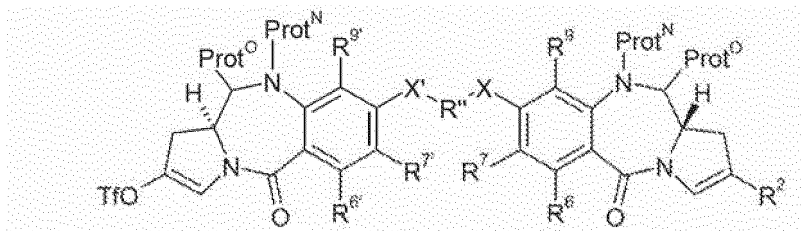


Fórmula 2

- 40 en la que R², R⁶, R⁷, R⁹, R⁶ⁱ, R⁷ⁱ, R⁹ⁱ, R¹², X, X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula I, Prot^N es un grupo protector de nitrógeno para la síntesis y Prot^O es un grupo de oxígeno protegido para la síntesis o un grupo oxo, desprotegiendo el enlace imina por métodos estándar.

- 45 El compuesto producido puede estar en su forma de carbinolamina o éter de carbinolamina dependiendo de los disolventes usados. Por ejemplo, si Prot^N es Troc y Prot^O es un grupo protector de oxígeno para la síntesis, entonces la desprotección se lleva a cabo usando un par de Cd/Pb para producir el compuesto de fórmula (I). Si Prot^N es SEM, o un grupo análogo y Prot^O es un grupo oxo, entonces el grupo oxo puede eliminarse por reducción, lo que conduce a un intermedio de carbinolamina protegida, que luego puede tratarse para eliminar el grupo protector SEM, seguido de la eliminación del agua. La reducción del compuesto de Fórmula 2 se puede realizar, por ejemplo, con superhidruro o tetraborohidruro de litio, mientras que un medio adecuado para eliminar el grupo protector SEM es el tratamiento con gel de sílice.

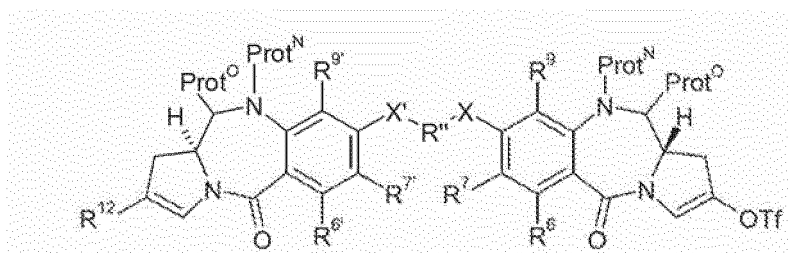
Los compuestos de fórmula 2 se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 3a:



Fórmula 3a

5 en la que R^2 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{12} , R^7 , R^9 , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R^{12} , tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o un ácido borónico.

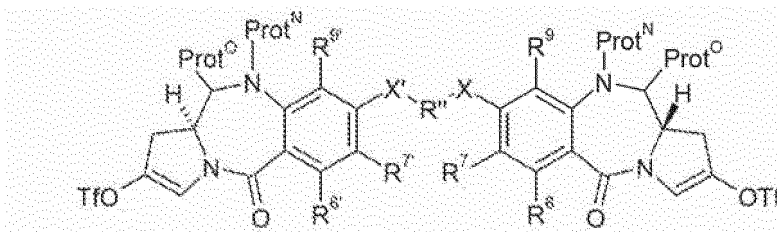
Los compuestos de fórmula 2 se pueden sintetizar a partir de un compuesto de fórmula 3b:



Fórmula 3b

10 en la que R^{12} , R^6 , R^7 , R^9 , R^6 , R^7 , R^9 , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R^2 , tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o un ácido borónico.

15 Los compuestos de fórmula 3a y 3b pueden sintetizarse a partir de un compuesto de fórmula 4:



Fórmula 4

20 en la que R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6 , R^7 , R^9 , X , X' y R'' son como se definen para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de aproximadamente un solo equivalente (p. ej., 0,9 o 1 a 1,1 o 1,2) de un derivado organometálico, tal como un derivado de organoboro, que comprende R^2 o R^{12} .

25 Los acoplamientos descritos anteriormente se llevan a cabo normalmente en presencia de un catalizador de paladio, por ejemplo $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{OCOCH}_3)_2$, PdCl_2 , $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$. El acoplamiento se puede llevar a cabo en condiciones convencionales, o también se puede llevar a cabo en condiciones de microondas.

30 Las dos etapas de acoplamiento normalmente se llevan a cabo secuencialmente. Pueden llevarse a cabo con o sin purificación entre las dos etapas. Si no se lleva a cabo la purificación, entonces las dos etapas se pueden llevar a cabo en el mismo vaso de reacción. La purificación normalmente se requiere después de la segunda etapa de acoplamiento. La purificación del compuesto a partir de los subproductos no deseados puede llevarse a cabo por cromatografía en columna o separación por intercambio iónico.

La síntesis de compuestos de fórmula 4 en la que Prot^{O} es un grupo oxo y Prot^{N} es SEM se describen en detalle en el documento WO 00/12508,

35 En particular, se hace referencia al esquema 7 en la página 24, en el que el compuesto anterior se designa como intermedio P. Este método de síntesis también se describe en el documento WO 2004/043963 y para todos los fines. También se hace referencia adicional a la síntesis de los compuestos 8a y 8b en el documento WO 2010/043880 (páginas 36 a 45), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines.

40 La síntesis de compuestos de fórmula 4 en la que Prot^{O} es un grupo de oxígeno protegido para la síntesis se

describe en el documento WO 2005/085251, cuya síntesis se incorpora en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones de la presente invención, particularmente cuando R¹² porta un sustituyente que es OH o CO₂H, se puede desear en los métodos anteriores añadir un derivado organometálico de R¹² en el que el grupo sustituyente está protegido. Por ejemplo, si R¹² porta CO₂H, se puede preferir unir un compuesto en el que el carboxi está protegido como un éster (p. ej., éster de alquilo C₁₋₄) y luego desproteger el grupo carboxi en una etapa posterior en la síntesis. Incluso se puede desproteger una vez que se ha añadido parte del grupo de enlazador para preparar el enlazador de fármaco. El sustituyente OH puede estar protegido por grupos protectores fenol como se conoce en la técnica.

Síntesis de conjugados de fármacos

Los conjugados que comprenden dímeros de PBD como se describe en el presente documento pueden prepararse usando el conocimiento del experto en la técnica en combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, los enlazadores se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.214.345, La Patente de EE.UU. n.º 7.498.298 así como en el documento WO 2009/0117531, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines. Se pueden preparar otros enlazadores de acuerdo con las referencias citadas en el presente documento o como conocen los expertos en la técnica.

Los compuestos de enlazador-fármaco se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica en combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, el enlace de sustituyentes de amina (de la unidad de dímero de PBD del fármaco) a los grupos activos de las unidades del enlazador se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos en general en la Patente de EE.UU. n.º 6.214.345 y 7.498.298 y el documento WO 2009-0117531, o como conocen de otra manera los expertos en la técnica. Algunos ejemplos se muestran a continuación.

Los anticuerpos pueden conjugarse con compuestos de enlazador-fármaco como se describe en Doronina y col., Nature Biotechnology, 2003, 21.778-784). En resumen, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS que contienen borato de sodio 50 mM a pH 7,4 se reducen con hidrocloreuro de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. El progreso de la reacción, que reduce los disulfuros intercatenarios, se controla por reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se deja avanzar hasta que se consigue el nivel deseado de tioles/mAb. El anticuerpo reducido se enfría luego a 0 °C y se alquila con 1,5 equivalentes de enlazador de fármaco maleimida por tiol de anticuerpo. Después de 1 hora, la reacción se interrumpe mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El enlazador de fármaco inactivado se elimina por filtración en gel sobre una columna PD-10. El CAF se filtra luego en condiciones estériles a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La concentración de proteína puede determinarse por análisis espectral a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con corrección por la contribución de la absorbancia del fármaco a 280 nm. La cromatografía de exclusión por tamaño se puede usar para determinar la extensión de la agregación de anticuerpos, y la RP-HPLC se puede usar para determinar los niveles del enlazador de fármaco inactivado con NAC restantes.

Los anticuerpos con restos de cisteína introducidos pueden conjugarse con compuestos de enlace-fármaco como se describe en la publicación de la Patente Internacional WO2008/070593, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines o de la siguiente manera. Los anticuerpos que contienen un resto de cisteína introducido en la cadena pesada se reducen completamente añadiendo 10 equivalentes de TCEP y EDTA 1 mM y ajustando el pH a 7,4 con tampón Tris 1 M (pH 9,0).

Después de una incubación de 1 hora a 37 °C, la reacción se enfría a 22 °C y se añaden 30 equivalentes de ácido deshidroascórbico para reoxidar selectivamente los disulfuros nativos, mientras que deja la cisteína introducida en el estado reducido. El pH se ajusta a 6,5 con tampón Tris 1 M (pH 3,7) y se deja que la reacción avance durante 1 hora a 22 °C. El pH de la solución se eleva de nuevo a 7,4 mediante la adición de tampón Tris 1 M (pH 9,0). Se colocan 3,5 equivalentes del enlazador de fármaco PBD en DMSO en un recipiente adecuado para la dilución con propilenglicol antes de la adición a la reacción. Para mantener la solubilidad del enlazador de fármaco PBD, el propio anticuerpo primero se diluye con propilenglicol hasta una concentración final de 33 % (p. ej., si la solución de anticuerpo estaba en un volumen de reacción de 60 ml, se añadieron 30 ml de propilenglicol). Este mismo volumen de propilenglicol (30 ml en este ejemplo) se añade al enlazador de fármaco PBD como diluyente. Después de mezclar, la solución de enlazador de fármaco PBD en propilenglicol se añade a la solución de anticuerpo para efectuar la conjugación; la concentración final de propilenglicol es del 50 %. La reacción se deja avanzar durante 30 minutos y luego se inactiva mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El CAF se purifica por ultrafiltración a través de una membrana de 30 kD. (Tenga en cuenta que la concentración de propilenglicol usada en la reacción puede reducirse para cualquier PBD especial, ya que su único fin es mantener la solubilidad del enlazador de fármaco en el medio acuoso).

Otras preferencias

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención como se describió anteriormente, o pueden referirse a un único aspecto. Las preferencias se pueden combinar juntas en cualquier combinación.

En algunas realizaciones, $R^{7'}$ es preferentemente igual que R^7 .

Enlace del dímero

- 5 R'' es preferentemente un grupo alquileo C_{3-7} sin sustituyentes. Más preferentemente R'' es un alquileo C_3 , C_5 o C_7 . Lo más preferente, R'' es un alquileo C_3 o C_5 .

R^7 y R^9

- 10 R^9 es preferentemente H.

R^7 es OR, en el que R es preferentemente un grupo alquilo C_{1-4} , que puede estar o no sustituido. Un sustituyente de interés es un grupo arilo C_{5-6} (p. ej., fenilo). Los sustituyentes particularmente preferentes en las posiciones 7 son OMe y OCH_2Ph . Otros sustituyentes de particular interés son $-(OC_2H_4)_qOMe$, en el que q es de 0 a 2.

- 15 Estas preferencias se aplican a $R^{9'}$ y $R^{7'}$ respectivamente.

R^2

- 20 En R^2 , en el que el grupo arilo (A) es fenilo, el sustituyente amino (Q^2-NH_2) está preferentemente en las posiciones meta- o para-, y más preferentemente está en la posición para-.

R^{12}

- 25 R^{12} es fenilo y porta un sustituyente seleccionado entre OH, CO_2H , y CO_2Me . El sustituyente puede ser cualquier posición.

El sustituyente está preferentemente en las posiciones meta- o para- y más preferentemente está en la posición para-.

- 30 Grupos R^{12}

Los grupos R^{12} sustituidos particularmente preferentes incluyen, pero sin limitación, 4-hidroxifenilo, 3-hidroxifenilo, 4-carboxi-fenilo, 3-carboxi-fenilo, 4-metiloxicarbonil-fenilo y 3-metiloxicarbonil-fenilo.

- 35 Por consiguiente, los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que

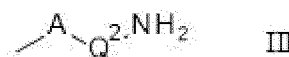
- 40 (i) R^2 es de fórmula III:



en la que A es un grupo fenilo y
 Q^2 se selecciona entre un enlace sencillo y $-CH_2-$,
 y el resto de los sustituyentes son como se define en el presente documento.

- 45 (ii) Los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que R^{12} es un grupo fenilo, sustituido con un grupo seleccionado entre CO_2H y CO_2Me y el resto de los sustituyentes son como se define en el presente documento.

- 50 (iii) Los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que R^2 es de fórmula III:



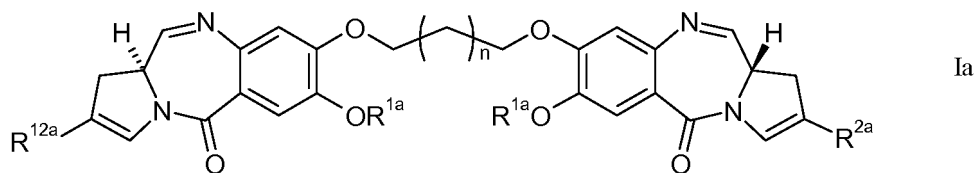
en la que A es un grupo fenilo y
 Q^2 se selecciona entre un enlace sencillo y $-CH_2-$;
 R^{12} es un grupo fenilo, sustituido con un grupo seleccionado entre OH, CO_2H y CO_2Me y el resto de los sustituyentes son como se define en el presente documento.

- 60

Los compuestos preferentes de la presente invención incluyen cualquiera de los descritos en (i) a (iii) en donde:

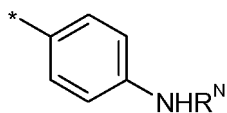
- (a) el grupo sustituyente en R^{12} está en la posición meta o para, y más preferentemente en la posición para.
- (b) Y e Y' son O,
- (c) R^n es $-(CH_2)-(CH_2)-(CH_2)-$ o $-(CH_2)-(CH_2)-(CH_2)-(CH_2)-(CH_2)-$,
- (d) R^{10} y R^{11} forman un enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos y R^{10} y R^{11} , forman un enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos,
- (e) R^7 es metoxi o etoxi y $R^{7'}$ es metoxi o etoxi, o
- (f) R^6 , R^9 , $R^{6'}$ y $R^{9'}$ son hidrógeno, o cualquier combinación de (a) a (f).

Los compuestos particularmente preferentes de la presente invención son de fórmula Ia:

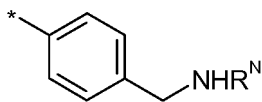


o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que

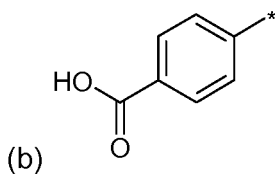
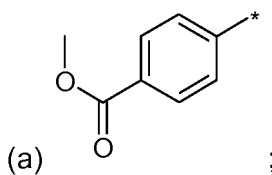
- n es 1 o 3;
- R^{1a} es metilo;
- R^{2a} es:



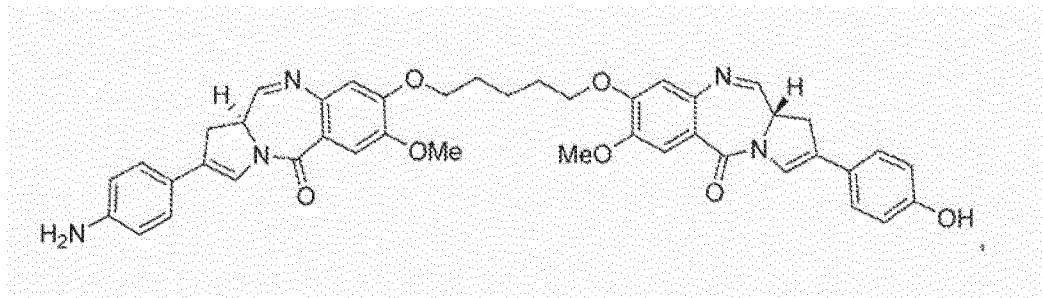
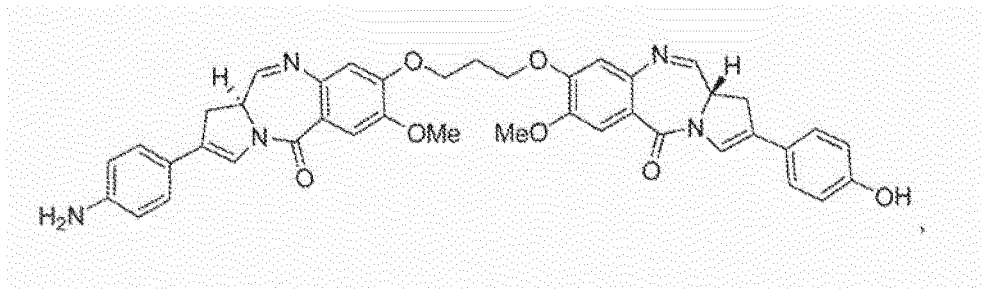
o

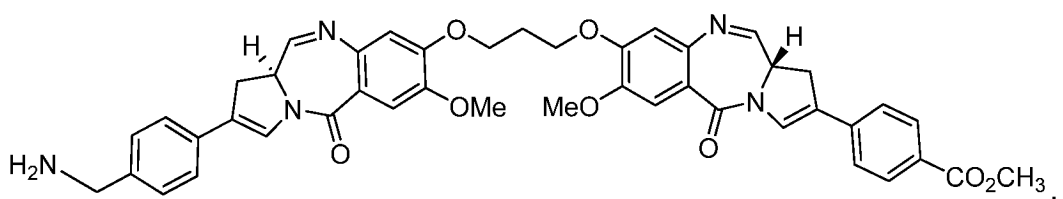
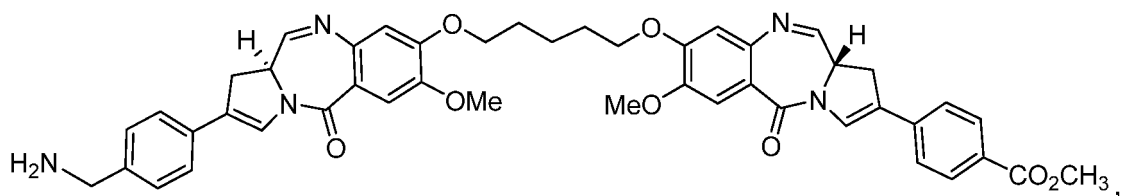
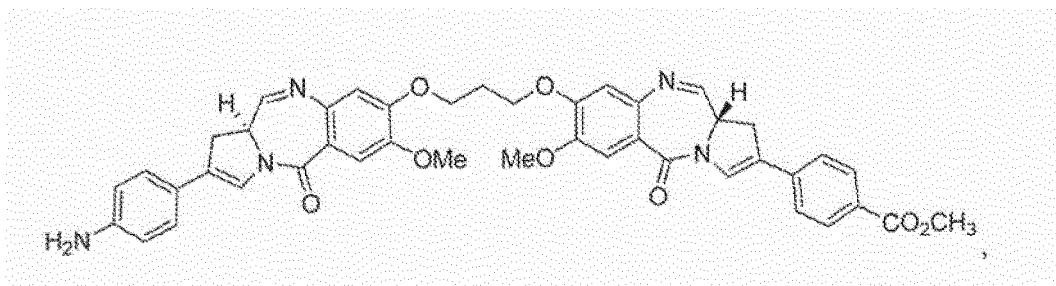
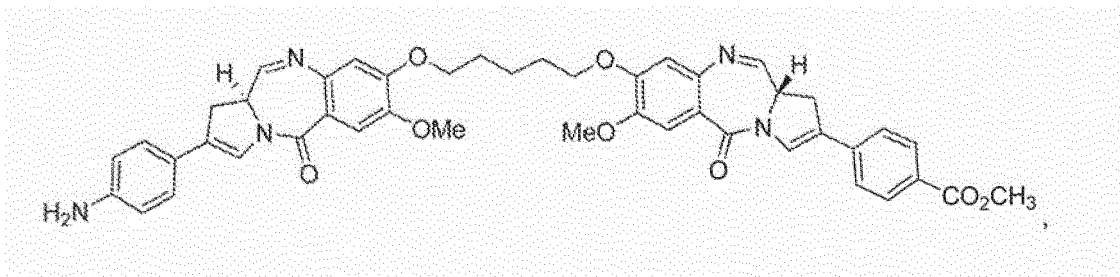
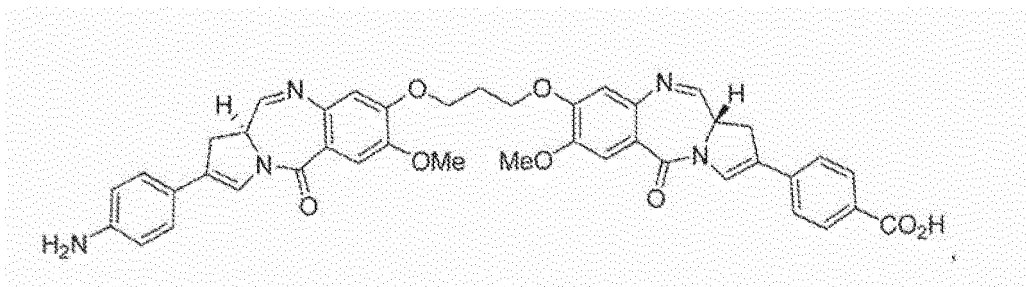
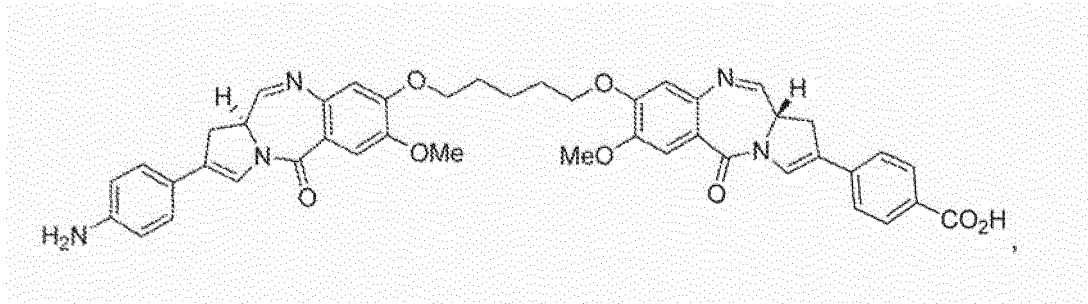


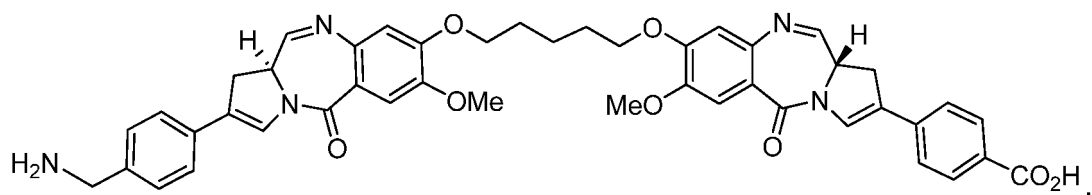
- en la que R^N es H;
- R^{12a} se selecciona entre:



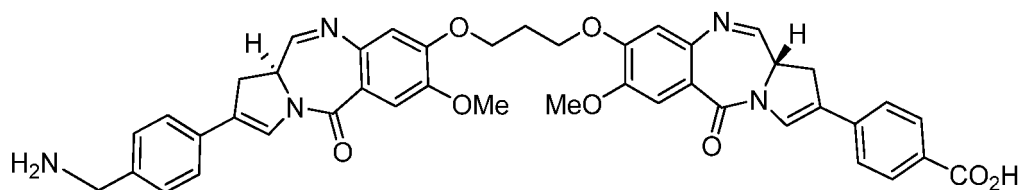
Los compuestos particularmente preferentes incluyen:







y



5

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de las mismas.

2º aspecto

10

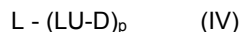
Las preferencias expresadas anteriormente para el primer aspecto se pueden aplicar a los compuestos de este aspecto, cuando sea adecuado.

15

Las preferencias para los compuestos de fórmula I se aplican cuando sea adecuado a D en el tercer aspecto de la invención. Por ejemplo, en el tercer aspecto, el dímero de PBD es cualquiera de los compuestos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, descritos en el presente documento, excepto que -NH₂ se sustituye con -N(H)-*, en el que el asterisco indica el punto de unión a la unidad de enlazador.

20

Por consiguiente, los conjugados de la presente invención incluyen donde tienen la siguiente fórmula (IV)



25

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que L es una unidad de ligando (es decir, un agente de dirección), U es una unidad de enlazador y el dímero D de PBD es cualquiera de los compuestos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, descritos en el presente documento, excepto que -NH₂ se sustituye con -N(H)-*, en el que el asterisco indica el punto de unión a la unidad de enlazador.

(a) Los conjugados de la presente invención incluyen, por ejemplo, los de fórmula:

30



en la que el asterisco indica el punto de unión al dímero (D) de PBD o a la unidad espaciadora. AUC es el agente de unión a la célula, L¹ es una unidad de especificidad que es escindible mediante la acción de una enzima y A¹ es una unidad de extensión que conecta L¹ al agente de unión celular.

35

(b) Los conjugados de la presente invención incluyen, por ejemplo, los de fórmula:

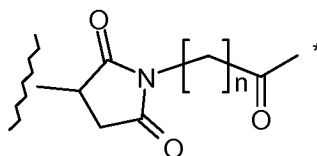


40

en la que el asterisco indica el punto de unión al dímero (D) de PBD, AUC es el agente de unión a la célula, A¹ es una unidad de extensión que conecta L¹ al agente de unión celular y L¹ es una unidad de especificidad que es escindible mediante la acción de la catepsina, L¹ es un dipéptido, L¹ es un dipéptido que es escindible mediante la acción de la catepsina o L¹ es un dipéptido seleccionado entre -Fe-Lis-, -Val-Ala-, -Val-Lis-, -Ala-Lis- y -Val-Cit-

45

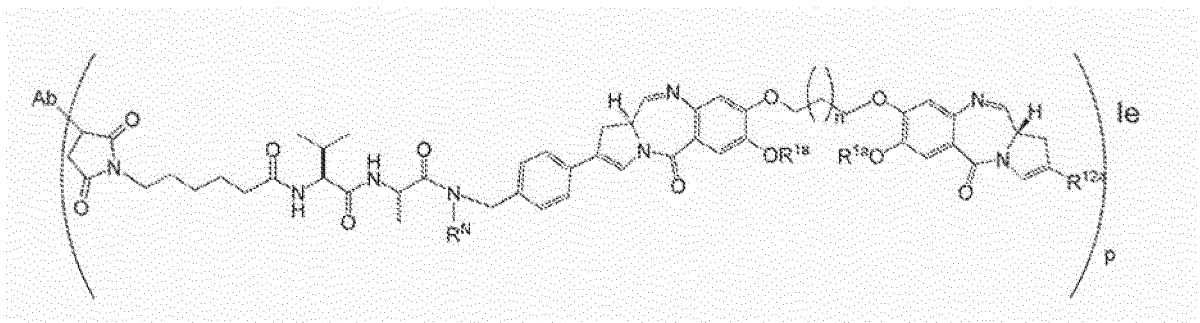
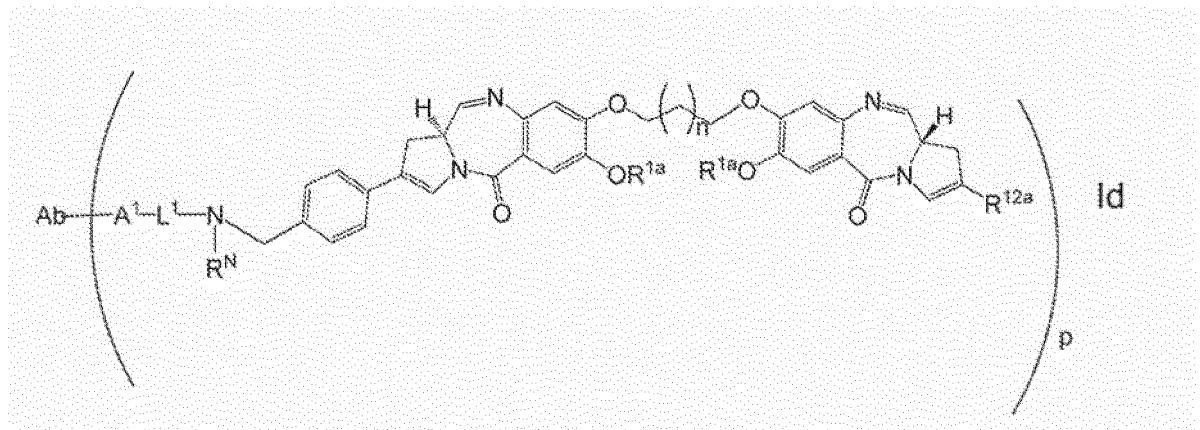
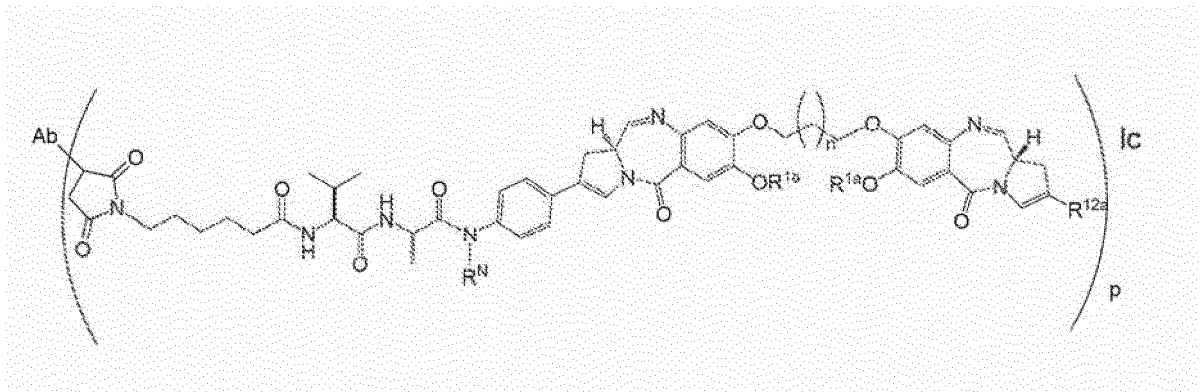
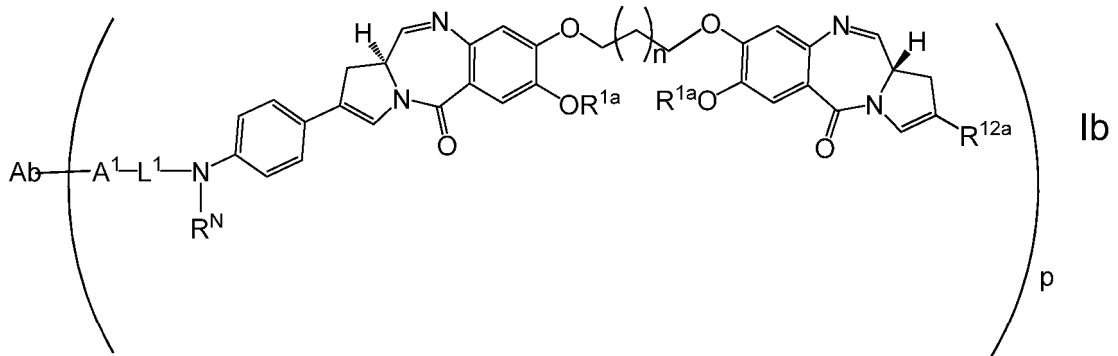
Los conjugados preferentes de la presente invención incluyen cualquiera de los descritos en (a)-(b) en donde A¹ es



en donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a AUC, y n es 0 a 6

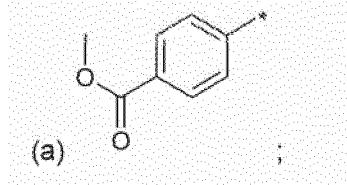
(preferentemente n es 5).

Los conjugados particularmente preferentes de la presente invención son de fórmula Ib, Ic, 1d y 1e:

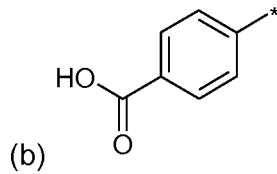


o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en las que

- 5 n es 1 o 3;
 R^{1a} es metilo;
 R^N es H
 R^{12a} se selecciona entre:



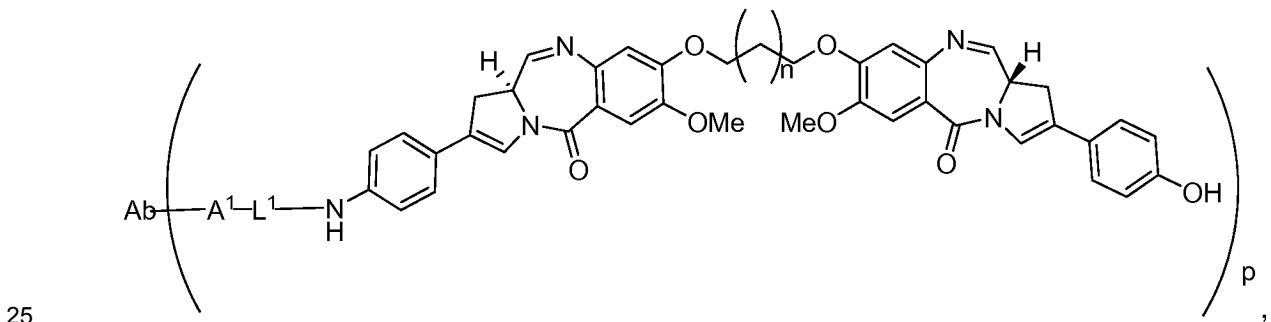
10 y

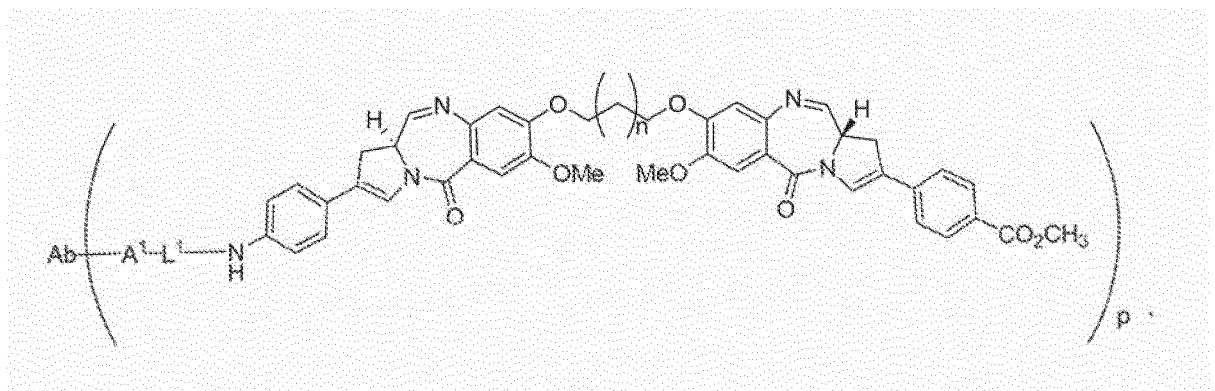
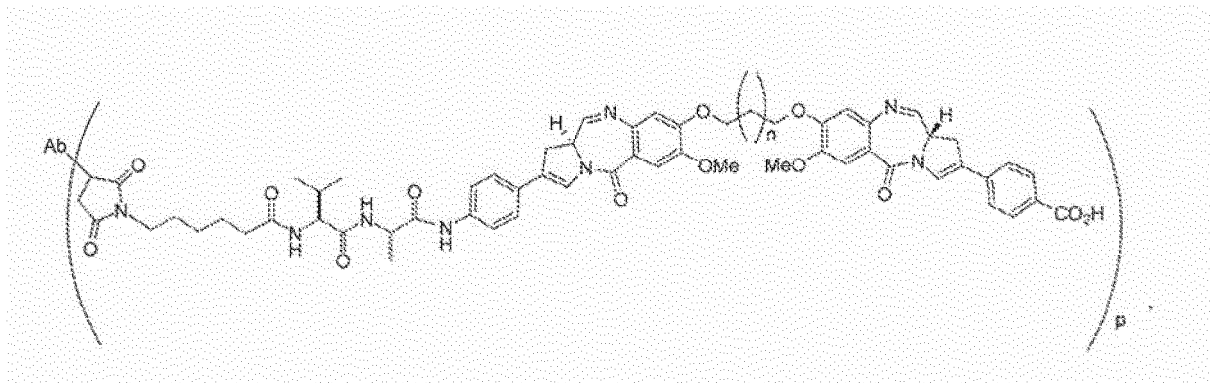
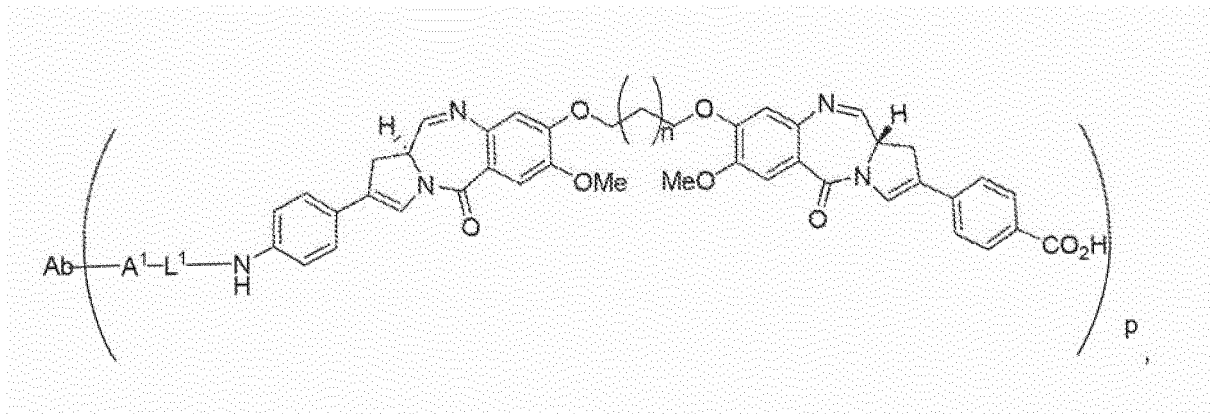
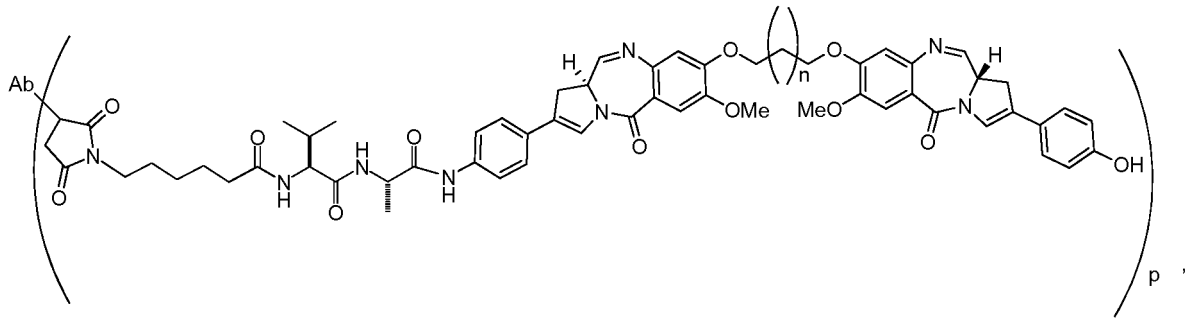


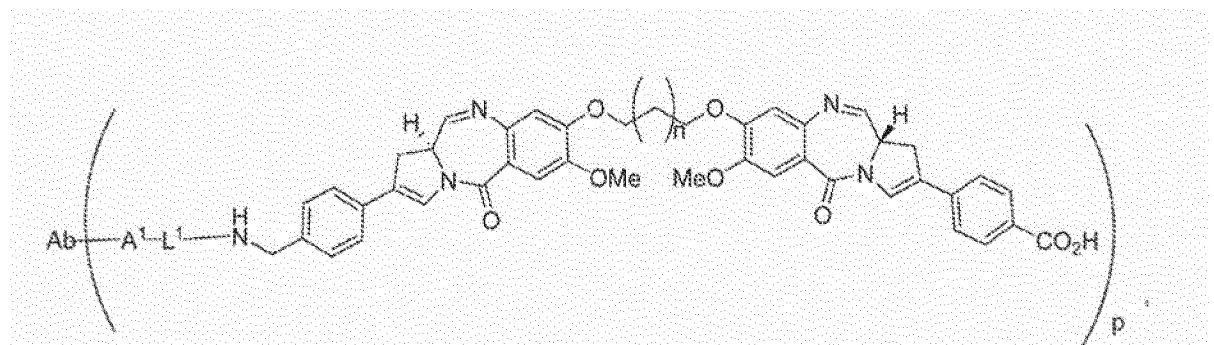
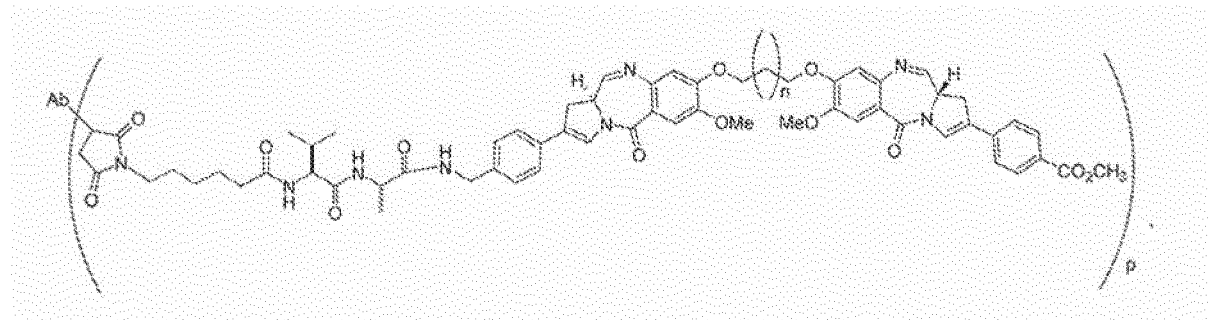
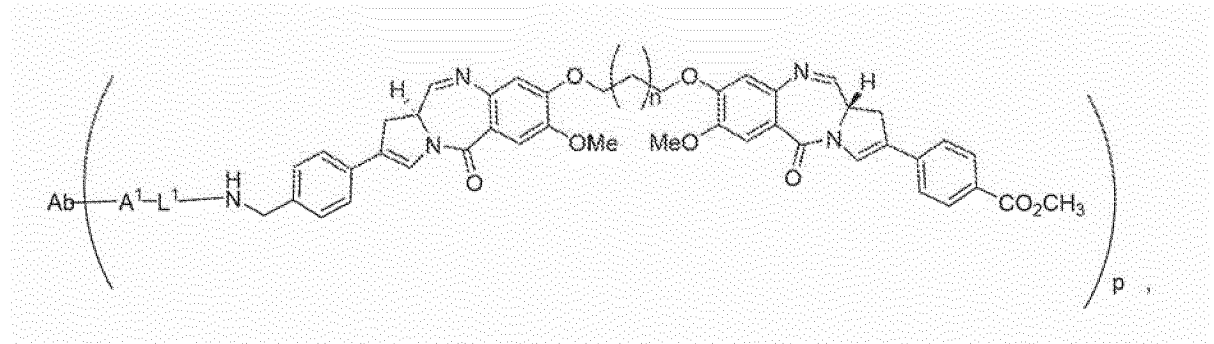
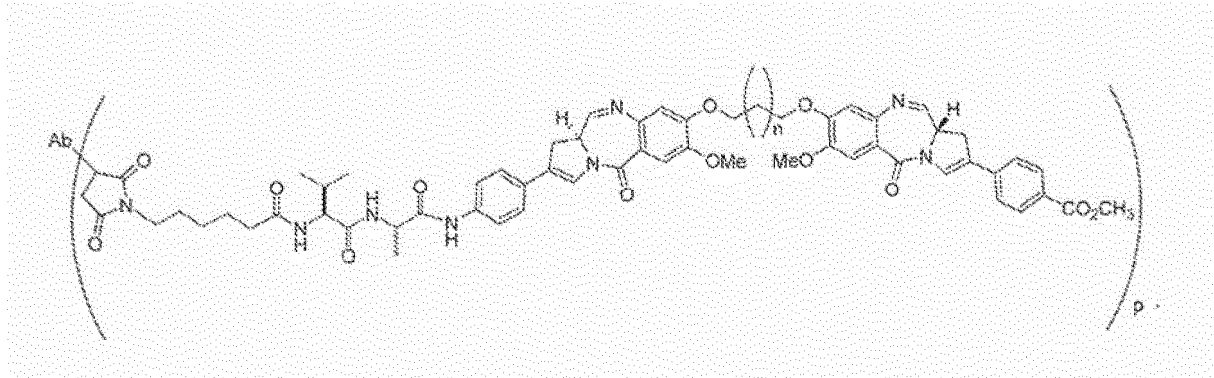
- 15 A^1 es una unidad de extensión;
 L^1 es un dipéptido que es escindible mediante la acción de la catepsina;
 Ab es un anticuerpo y
 p es de 1 a 20.

20 En una realización particularmente preferente de fórmulas Ib, Ic, Id y Ie, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de las mismas, la conexión entre el anticuerpo y la unidad de enlazador se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína del anticuerpo y un grupo maleimida de la unidad del enlazador.

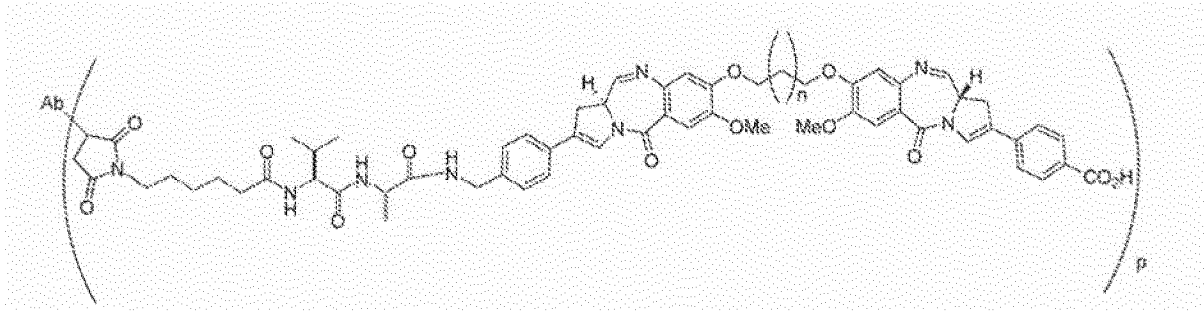
Los conjugados particularmente preferentes incluyen:







y



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en las que

5 n es 1 o 3.

A¹ es una unidad de extensión;

L¹ es un dipéptido que es escindible mediante la acción de la catepsina;

Ab es un anticuerpo y

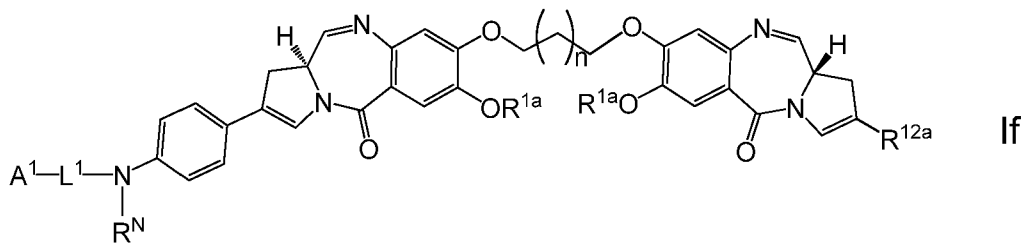
p es de 1 a 20.

10 En una realización particularmente preferente, para todos estos conjugados preferentes, la conexión entre el anticuerpo y el enlazador se forma entre un grupo tiol de un resto de cisteína del anticuerpo y un grupo maleimida de la unidad del enlazador.

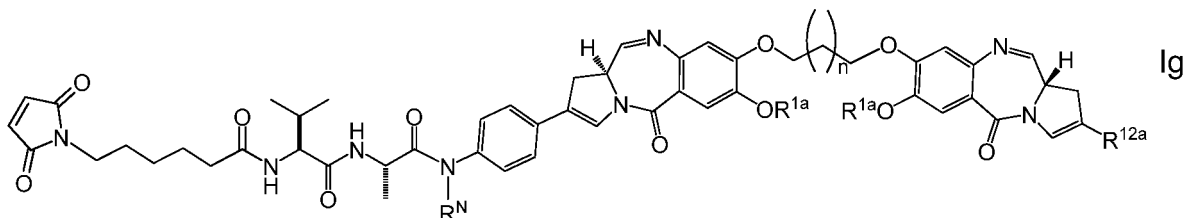
15 En una realización particularmente preferente, para todos estos conjugados preferentes, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno Cripto, al antígeno CD19, al antígeno CD20, al antígeno CD22, al antígeno CD30, al antígeno CD33, a la glicoproteína NMB, al antígeno CanAg, al antígeno Her2 (ErbB2/Neu), al antígeno CD56 (NCAM), al antígeno CD70, al antígeno CD79, al antígeno CD138, al PSCA, al PSMA (antígeno prostático específico de membrana), al BCMA, a la E-selectina, a la EphB2, a la melanotransferina,
20 al antígeno Muc16 o al antígeno TMEFF2.

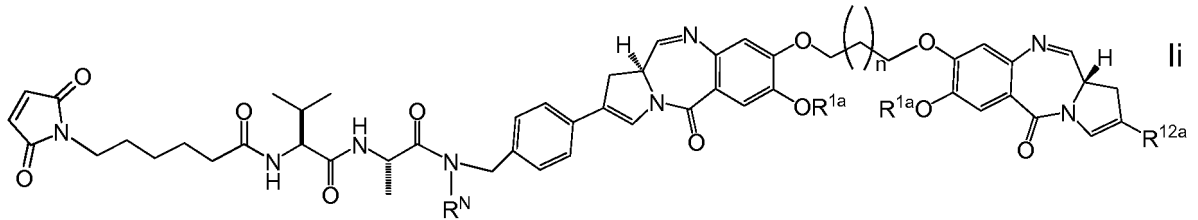
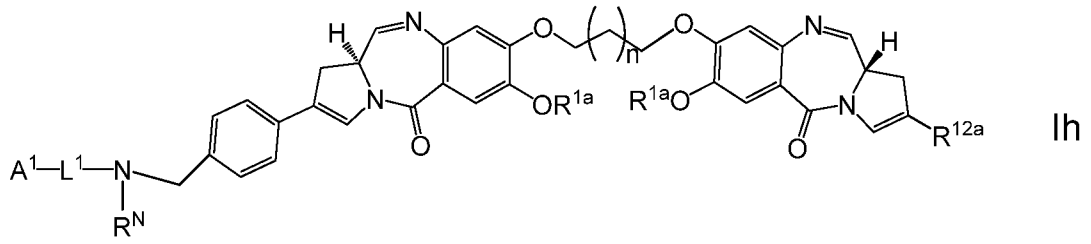
Las preferencias para los compuestos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, se aplican cuando sea adecuado para D en el cuarto aspecto de la invención. Por ejemplo, en el cuarto aspecto, el dímero de PBD es cualquiera de los compuestos de fórmula I, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, descritos en el presente documento excepto que -NH₂ se sustituye con -N(H)-*, en donde el asterisco indica
25 el punto de unión a la unidad de enlazador.

Los enlazadores de fármaco particularmente preferentes de la presente invención son de fórmula If, Ig, Ih e li:



30





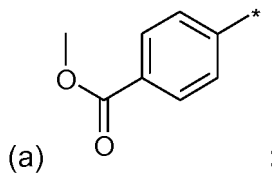
5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en las que

n es 1 o 3;

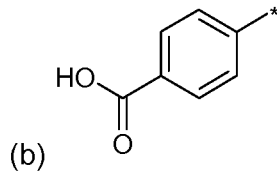
R^{1a} es metilo o fenilo;

R^N es H

10 R^{12a} se selecciona entre:



15 y

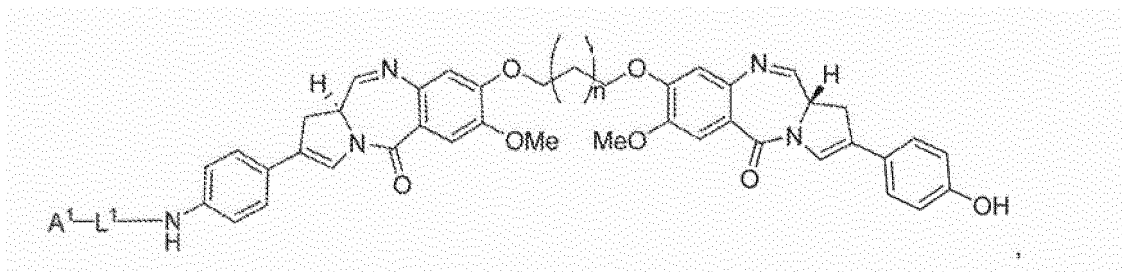


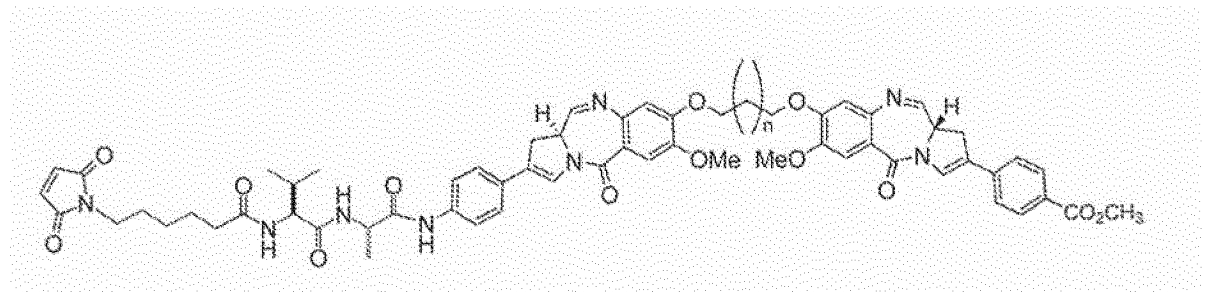
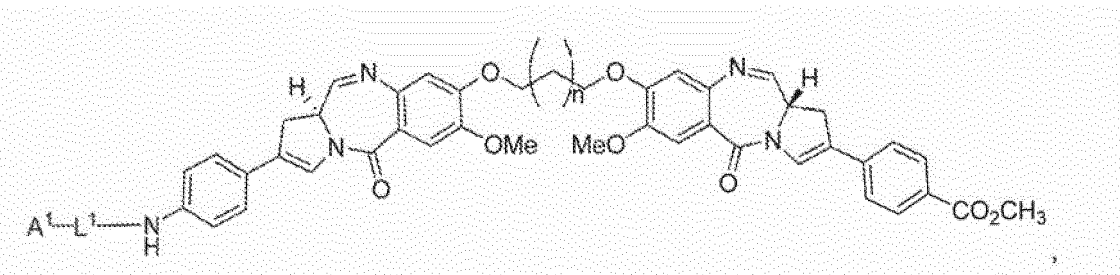
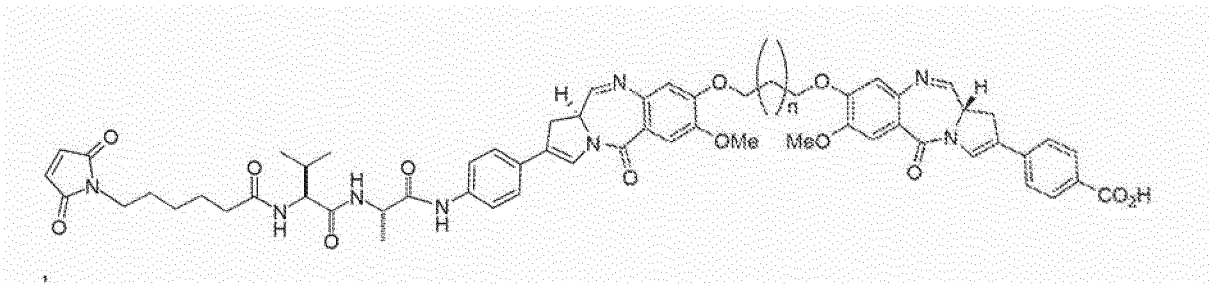
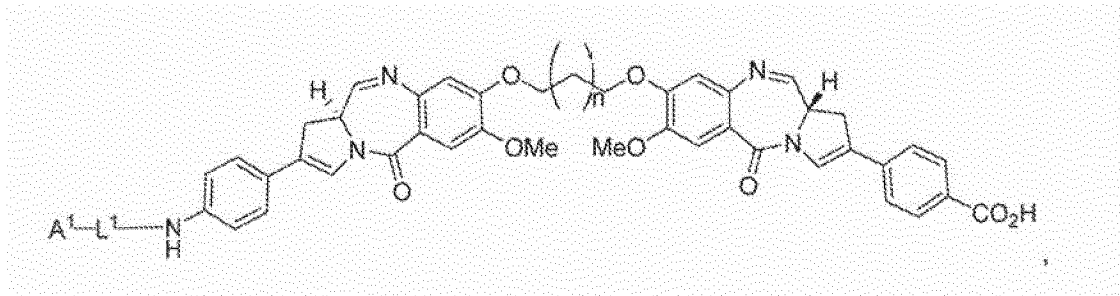
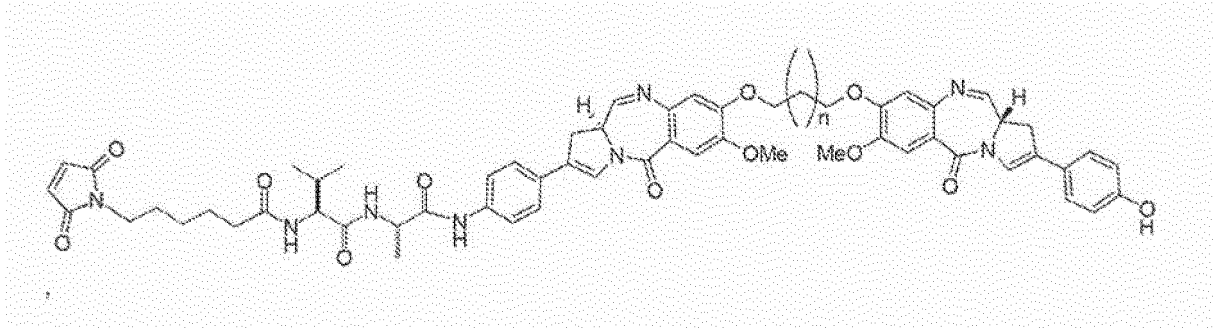
A¹ es una unidad de extensión y

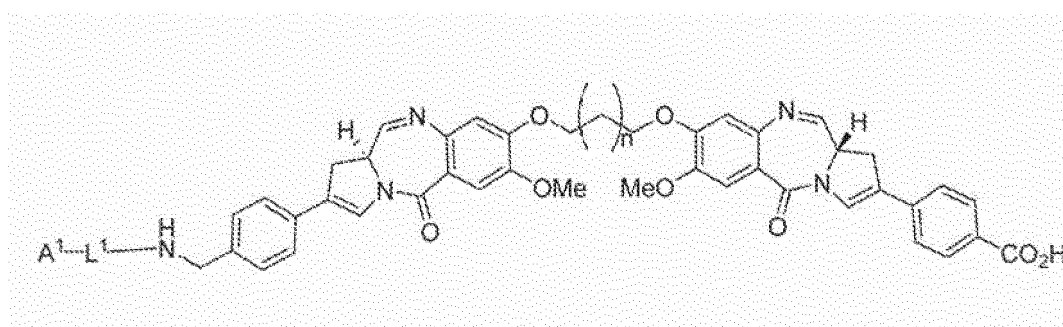
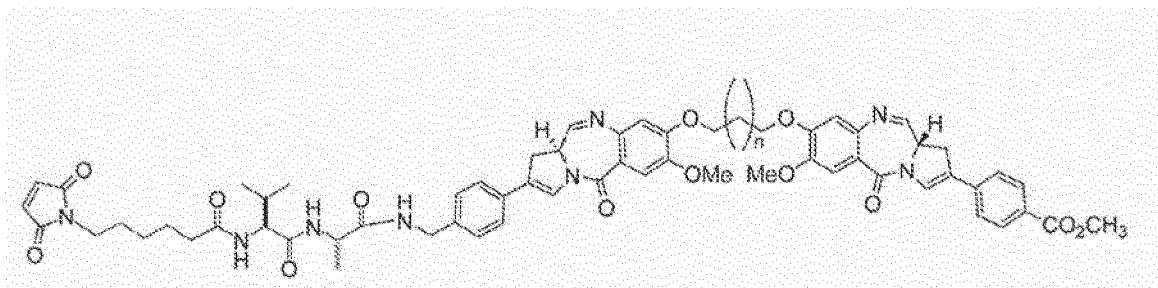
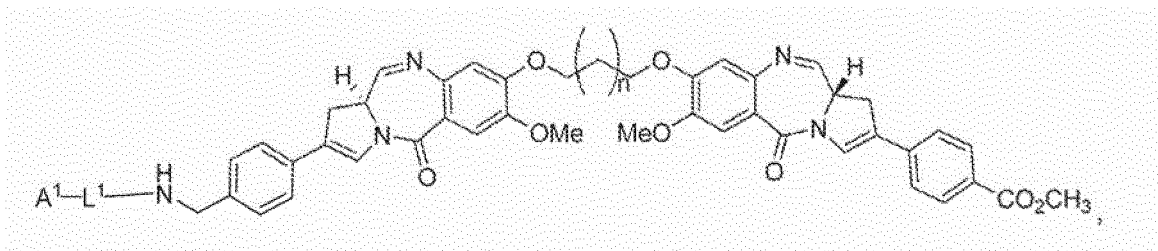
L¹ es un dipéptido que es escindible mediante la acción de la catepsina.

20

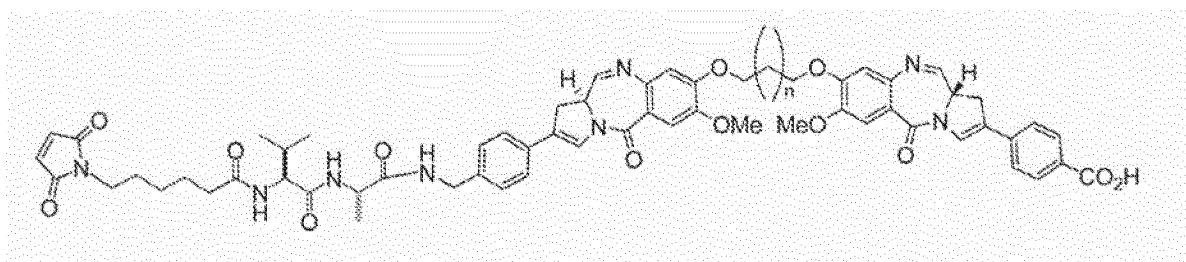
Los enlaces de fármaco particularmente preferentes incluyen:







5 y



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en las que

10

n es 1 o 3.

A¹ es una unidad de extensión y

L¹ es un dipéptido que es escindible mediante la acción de la catepsina.

15 **Ejemplos**

Métodos experimentales generales para el Ejemplo 1

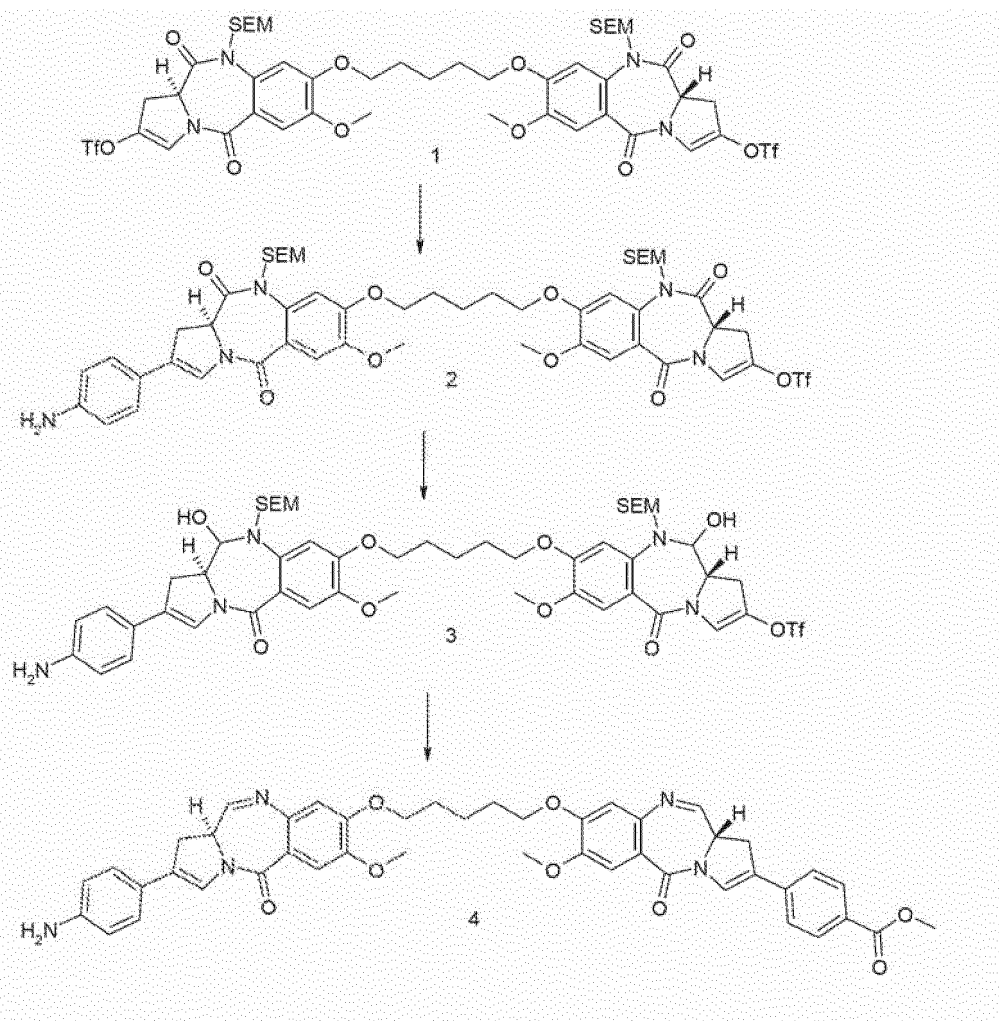
Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Belitngam Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se dan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato digital de punto de fusión (electrotérmico). Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT IR. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se presentan relativos a TMS (δ = 0,0 ppm), y las señales se designan como s (singlete), d (doblete), t (tripleto), dt (doblete tripleto), dd (doblete de dobletes), ddd (doble doblete de dobletes) o m (multiplete), con constantes de acoplamiento dadas en hercios (Hz). Los datos de la espectroscopía de masas (EM) se recogieron usando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a una HPLC Waters 2695 con un Waters 2996

25

PDA. Los parámetros de Waters Micromass ZQ usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente (°C), 100; temperatura de desolvatación (°C), 200; caudal del cono (L/h), 50; caudal de desolvatación (L/h), 250. Se registraron datos de espectroscopía de masas de alta resolución (EMAR) en un Waters icromass QTOF Global en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubierto de metal para introducir las muestras en el instrumento. La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, malla 230-400 ASTM). Excepto por el HOBt (Novabiochem) y los reactivos soportados en sólido (Argonaut), todos los demás productos químicos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron tal como se suministran sin purificación adicional. Los disolventes anhidros se prepararon por destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seco en presencia de un agente de secado adecuado y se almacenaron sobre tamices moleculares 4A o alambre de sodio. El éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60 °C.

Condiciones generales de CL/EM: La HPLC (Waters Alliance 2695) se llevó a cabo usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min y después 5 % de B hasta 95 % de B a menos de 3 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min a 95 % de B, y luego regresó a 5 % de B en 0,3 minutos. El tiempo total de ejecución de gradiente es igual a 5 min. El caudal 3,0 ml/min, 400 µl se dividió a través de una pieza en T de volumen muerto cero que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de la longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 exploraciones). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

Ejemplo 1



25 (a) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-2-(trifluorometilsulfonil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5-10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-iloxi)pentoxioxi)-10-((2-(trimetil-silil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5,11(10H, 11aH)-diona(2)

30 1,1'-[[[pentano-1,5-diil]dioxi]bis(11aS)-7-metoxi-2-[[trifluorometil]sulfonil]oxi]-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrol[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-5,11-diona] (1)(El compuesto 8b en el documento WO

2010/043880) (2,8 g, 2,4 mmol, 1equiv.) se añadió a una mezcla de carbonato de sodio (388 mg, 3,66 mmol, 1,52 equiv.) y 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano-2-il)anilina (509 mg, 2,32 mmol, 0,95 equiv.), en tolueno/agua/etanol (20 ml/10 ml/10 ml). El matraz de reacción se lavó abundantemente con argón y se añadió tetraquis trifenilfosfina Pd (0) sólida (84 mg, 0,072 mmol, 0,03 eq). La reacción se dejó avanzar durante 2 horas a 26 °C con agitación vigorosa en atmósfera de argón. La mezcla se repartió entre acetato de etilo (200 ml) y agua (100 ml). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml), seguido de salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y los volátiles se retiraron por evaporación rotatoria, seguido de alto vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente acetato de etilo/hexano, 30/70 hasta 100/0, v/v). El amino triflato asimétrico (2) se aisló con un rendimiento del 46 % (1,23 g). CL/EM ta 3,80 min m/z (1087,6) M + H. También se obtuvieron 932 mg (33 %) de material de partida y 400 mg (16 %) de producto simétrico 4-amino fenilo.

(b) (S)-8-((5-(((S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]diazepin-2-il trifluorometanosulfonato(3)

El amino triflato (2) se disolvió en THF seco (15 ml) y se enfrió a -78 °C. (1,2 g, 1,1 mmol, 1 eq). Una solución de súper hidruro en THF (1 M, 3,3 ml, 3,3 mmol, 3 eq) se inyectó lentamente en la mezcla de reacción agitada. Se observó terminación de la reacción después de 15 minutos. La mezcla de reacción se inactivó con agua (10 ml) y después se extrajo con DCM (50 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con agua (100 ml) y después salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y los volátiles se retiraron por evaporación rotatoria, seguido de alto vacío. La carbinolamina bruta (3) (1,10 g) no se purificó y se usó directamente en la siguiente etapa. CL/EM ta 2,68 min m/z (796) M+H para la imina SEM desprotegida (autoinmolación en las condiciones ácidas de la CL/EM).

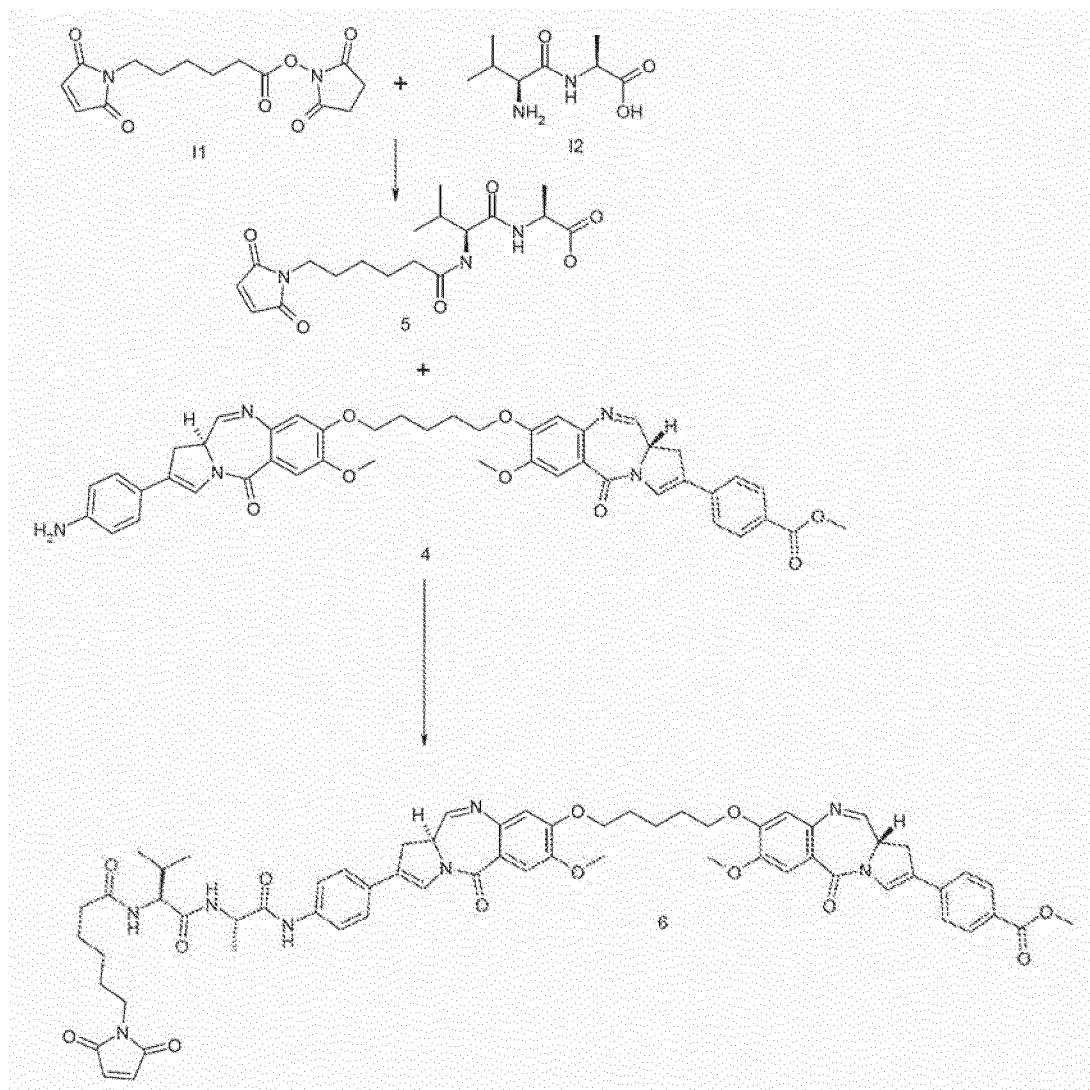
(c) (S)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-8-(5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metiloxicarbonilfenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5(11aH)ona (4)

La carbinolamina triflato bruta (3) protegida con SEB obtenida en la etapa anterior (1,10 g, 1 mmol, 1 eq.) se añadió a una mezcla de carbonato de sodio (341 mg, 3,2 mmol, 3,2 eq) y éster metílico del ácido fenilborónico (286 mg, 1,6 mmol, 1,6 eq), en tolueno/agua/metanol/THF (10 ml/5 ml/5 ml/5 ml). El matraz de reacción se lavó abundantemente con argón y se añadió tetraquis trifenilfosfina Pd (0) sólida (35 mg, 0,030 mmol, 0,03 eq). La reacción se dejó avanzar durante una noche con agitación vigorosa bajo atmósfera de argón. La mezcla se repartió entre acetato de metilo (200 ml) y agua (100 ml). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml), seguido de salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y los volátiles se retiraron por evaporación rotatoria, seguido de alto vacío. El residuo se trató con DCM (50 ml), etanol (140 ml), agua (70 ml) y gel de sílice (100 g). La mezcla viscosa se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla se filtró lentamente a través de un embudo sinterizado y el residuo de sílice se lavó con cloroformo/metanol 90/10 v/v (500 ml). La fase orgánica se lavó con agua (300 ml) y salmuera (100 ml), se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el material bruto que se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente metanol/cloroformo, 0/100 hasta 4/96, v/v) para producir 200 mg (25 %) de dímero de PBD ta CL/EM rt 2,68 min m/z (782) M+H.

Métodos experimentales generales para los Ejemplos 2 a 3

Todos los disolventes anhidros disponibles en el mercado se usaron sin purificación adicional. La cromatografía de capa fina analítica se realizó sobre láminas de aluminio de gel de sílice 60 F254 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). La cromatografía radial se realizó en un aparato Cromatotrón (Harris Research, Palo Alto, CA). La HPLC analítica se realizó en un sistema de entrega de disolvente Varian ProStar 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Las muestras se eluyeron en una columna C12 Phenomenex Synergi 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80 Å de fase inversa. La fase móvil ácida consistía en acetonitrilo y agua conteniendo ambos ácido fórmico al 0,1 %. Los compuestos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo ácido del 5 % a 1 min después de la inyección, a 95 % a 11 min, seguido de isocrático de 95 % de acetonitrilo a 15 minutos (caudal = 1,0 ml/min), CL-EM se realizó en un espectrómetro de masas ZMD Micromass interconectado con un instrumento HP Agilent 1100 HPLC equipado con una columna C12 Phenomenex Synergi 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80 Å de fase inversa. El eluyente ácido consistía en un gradiente lineal de acetonitrilo del 5 % al 95 % en ácido fórmico acuoso al 0,1 % durante 10 min, seguido de isocrático de 95 % de acetonitrilo durante 5 min (caudal = 0,4 ml/min). La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema de entrega de disolvente Varian ProStar 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Los productos se purificaron sobre una columna C12 Phenomenex Synergi 10,0 x 250 mm, 4 µm, 80 Å de fase inversa eluyendo con ácido fórmico al 0,1 % en agua (disolvente A) y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (disolvente B). El método de purificación consistió en el siguiente gradiente de disolvente A a disolvente B: 90:10 de 0 a 5 min; 90:10 a 10:90 de 5 min a 80 min seguido de isocrático 10:90 durante 5 min. El caudal fue de 4,6 ml/min con seguimiento a 254 nm.

Ejemplo 2

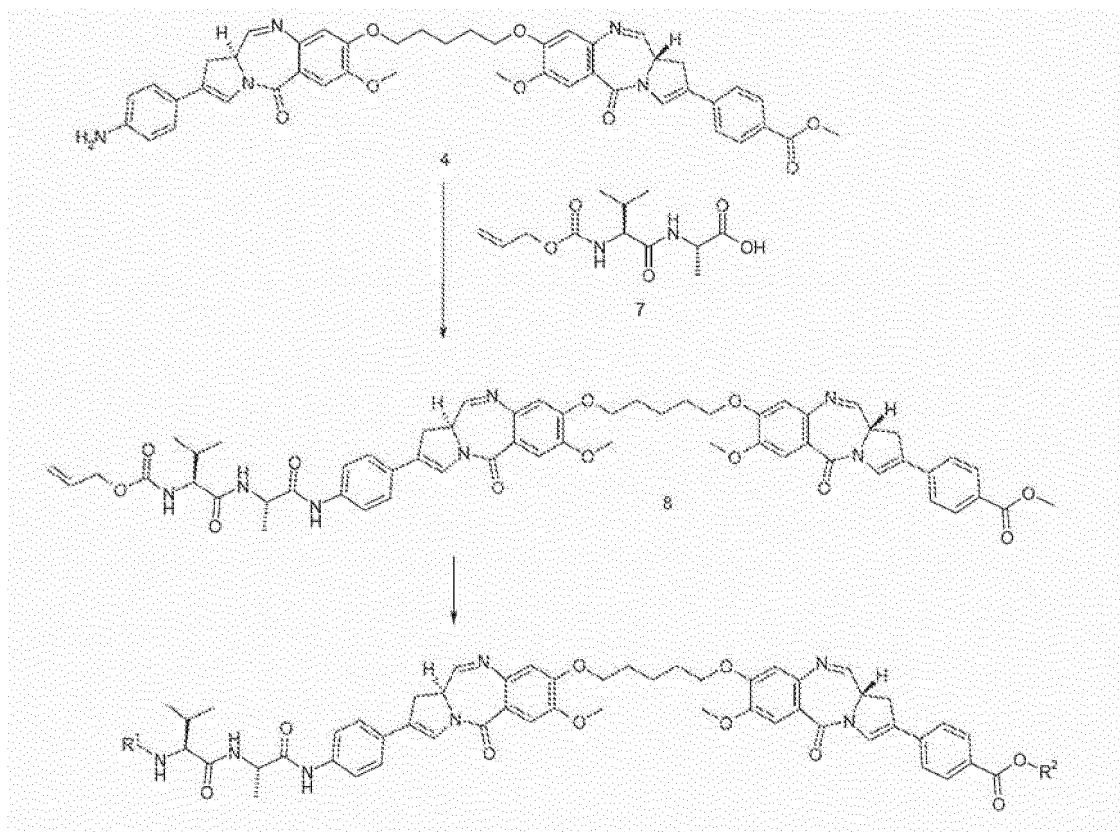
5 (A) *Ácido (S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanoico (5)*

Se colocaron maleimidocaproil N-hidroxisuccinimida (1,619 g, 5,25 mmol, 1,05 eq.) y H-Val-Ala-OH (0,941 g, 5 mmol, 1 equiv.) en un matraz de recuperación de 25 ml con una barra de agitación y el matraz se lavó abundantemente con nitrógeno. Se añadió DMF (4,7 ml) y la suspensión blanca resultante se agitó. Se añadió DIPEA (0,87 ml, 5 mmol, 1 eq) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se enfrió en un baño de hielo/agua y se añadió HCl 2 M (3 ml, 6 mmol) gota a gota. La mezcla viscosa se transfirió a un embudo de separación y el vaso de reacción se enjuagó con NaCl sat. (7 ml), EtOAc (10 ml), NaCl sat. (10 ml) y EtOAc (5 ml). Después de la separación de la fase acuosa, se extrajo con EtOAc adicional (2 x 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl sat. (4x15 ml) hasta que los lavados eran de pH~3,5. Los extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para producir un producto bruto **5** en forma de un sólido de color blanco (2,172 g, rendimiento bruto de 114 %) El compuesto bruto **5** se suspendió en CH₂Cl₂ caliente (35 ml) y se filtró para retirar un sólido fino de color blanco. Los sólidos se enjuagaron con CH₂Cl₂ adicional (3 ml). Se añadió tolueno (5 ml) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo/agua, lo que dio como resultado una suspensión espesa. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavó con una mezcla fría de CH₂Cl₂ (12 ml) y tolueno (2 ml) y se secó haciendo circular aire a través de la muestra durante una noche para producir **5** en forma de un sólido de color blanco (1,327 g, rendimiento 70 %). CCF: R_f = 0,28, 10 % MeOH en CH₂Cl₂. ¹H RMN (CDCl₃) (ppm) 0,95 (d, J = 17 Hz, 3H), 0,98 (d, J = 17 Hz, 3H), 1,30 (m, 2H), 1,40 (d, J = 17 Hz, 3H), 1,61 (m, 4H), 2,06 (m, 1H), 2,25 (dt, J = 4,19 Hz, 2H), 3,35 (s, 1H), 3,49 (t, J = 17 Hz, 2H), 4,20 (d, J = 18 Hz, 1H), 4,38 (m, 1H), 6,80 (s, 2H). HPLC analítica(ácido fórmico al 0,1 %): t_R 9,05 min. CL-EM: t_R 11,17 min, m/z (EP⁺) observado 381,9 (M+H)⁺, m/z (EP⁻) observado 379,9 (M-H)⁻.

(b) Metil 4-((S)-8-((5-(((S)-2-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2, 5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)benzoato (6)

- 5 Un matraz de 10 ml se cargó con **5** (11 mg, 29 μ mol), EEDQ (8,9 mg, 36 μ mol) y 0,46 ml de CH_2Cl_2 anhidro. Se añadió metanol (24 μ l) para facilitar la disolución y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 15 min. A continuación se añadió anilina **4** (18 mg, 24 μ mol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, momento en el cual CLEM reveló la conversión en producto. La reacción se concentró, se disolvió en CH_2Cl_2 (1 ml) y se purificó por cromatografía radial sobre una placa cromatotrón de 1 mm eluyendo con mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100:0 a 90:10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$) para proporcionar **6** (9,9 mg, 36 %). HPLC analítica: t_R 12,10 min. CL-EM: t_R 12,91 min, m/z (ES^+) observado 1145,6 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Ejemplo 3



15

9: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$

10: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{H}$

11: $\text{R}^1 = \text{MC}$, $\text{R}^2 = \text{H}$

20

El compuesto **7** se preparó de una forma similar al compuesto **5** en el Ejemplo 2(a) usando cloroformiato de alilo en lugar de maleimidocaproil N-hidroxisuccinimida y diclorometano como disolvente de reacción.

(a) Metil 4-((S)-8-(3-(((S)-2-(4-((S)-2-((S)-2-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)benzoato (**8**)

25

A un compuesto **7** (52 mg, 0,192 mmol) en metanol al 5 %/diclorometano (3 ml) a 0 °C se añadió EEDQ (47 mg, 0,193 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 minutos antes de la adición de **4** (50 mg, 0,064 mmol). La mezcla de reacción se dejó calentar a una temperatura ambiente y se controló por CL-EM. La mezcla se aspiró en una placa cromatotrón radial de 1 mm y se eluyó con metanol de 1 al 3 %/diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para producir 43 mg (65 %) de **8** en forma de un sólido de color amarillo: EM (ES^+) m/z 1036,87 [$\text{M}+\text{H}^+$].

30

(b) Metil 4-((S)-8-(3-(((S)-2-(4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5, 11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)benzoato (**9**)

35

A una solución de **8** (43 mg) en diclorometano anhidro (3 ml) se añadió Ph₃P (0,5 mg, 0,002 mmol), pirrolidina (7 µl, 0,082 mmol) y tetraquis paladio (1,1 mg, 0,001 mmol). Después de aproximadamente 30 minutos, la mezcla de reacción se aspiró en una placa cromatotrón radial de 1 mm y se eluyó con metanol al 5 % y después 10 % en diclorometano. La banda principal se recogió y se concentró a presión reducida para producir 22 mg (56 %) de **9**: EM (ES⁺) m/z 952,5 [M+H]⁺.

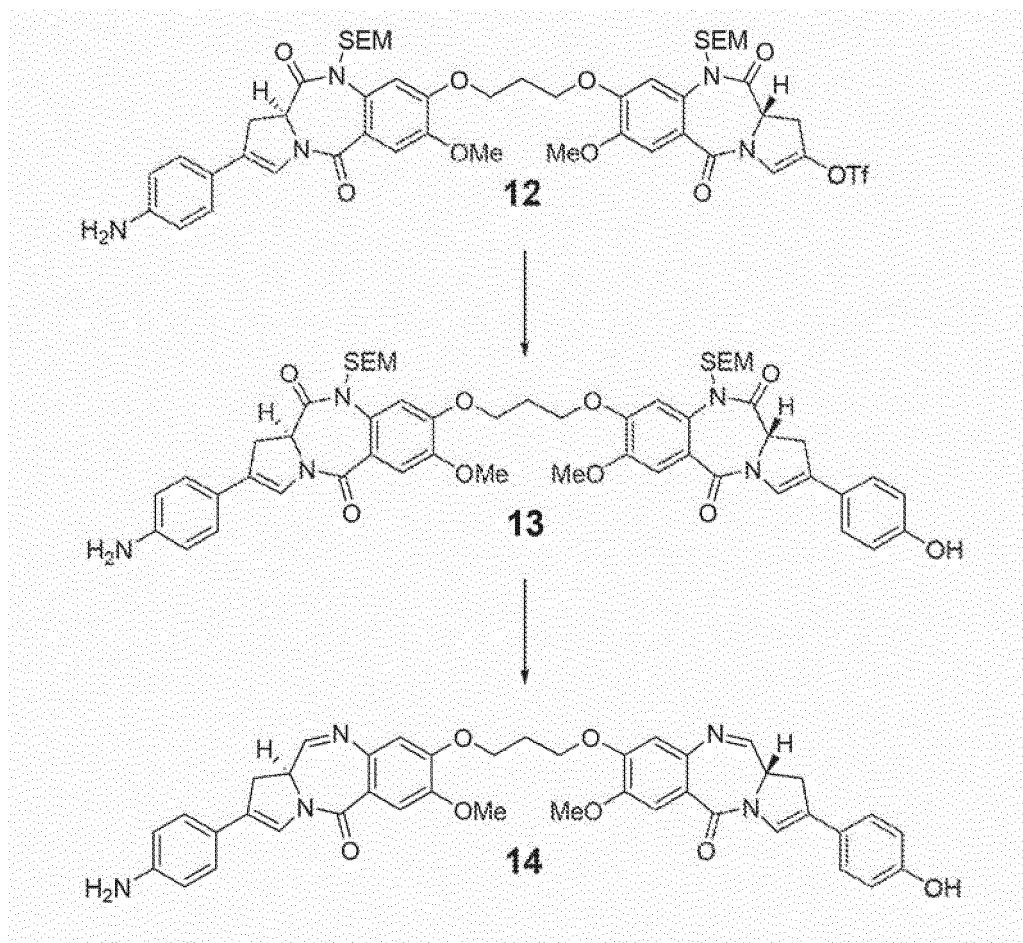
(c) Ácido 4-((S)-8-(3-(((S)-2-(4-(((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)benzoico (10)

A **9** (20 mg) en THF/CH₃OH (2 ml) se añadió una solución de hidróxido de litio (1 ml de una solución 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó a una temperatura ambiente. Transcurridas 5 horas, CL-EM reveló aproximadamente un 30 % de conversión en el producto deseado con una descomposición significativa. La mezcla de reacción se enfrió a -80 °C durante 16 horas. CL-EM mostró una mezcla ~1:1 de **10** y **9**. La mezcla de reacción se neutralizó con HCl 0,1 N (~1 ml) y se concentró a aproximadamente 1 ml. Se añadió DMSO (1 ml) y CH₃CN (1 ml) y la mezcla se purificó por HPLC de fase inversa preparatoria. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron. Esto dio lugar a 1,7 mg (9 %) de **10** en forma de una película de color amarillo: EM (ES⁺) m/z 938 [M+H]⁺.

(d) Ácido 4-((S)-8-(3-(((S)-2-(4-(((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)benzoico (11)

A una mezcla de **10** (1,7 mg, 1,8 µmol) en DMF (100 µl) se añadió DIPEA (1 µl, 5,75 µmol) y maleimidocaproil-NHS éster (4,6 mg, 15 µmol). La reacción se controló por CL-EM. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se disolvió en 0,5 ml de DMSO, 0,5 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de agua, y se purificó por HPLC de fase inversa preparatoria. La fracción que contenía el producto se congeló y se liofilizó para producir 0,2 mg (10 %) de **11**: EM (ES⁺) m/z 1131,6 [M+H]⁺.

Ejemplo 4



(a) (S)-2-(4-aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-

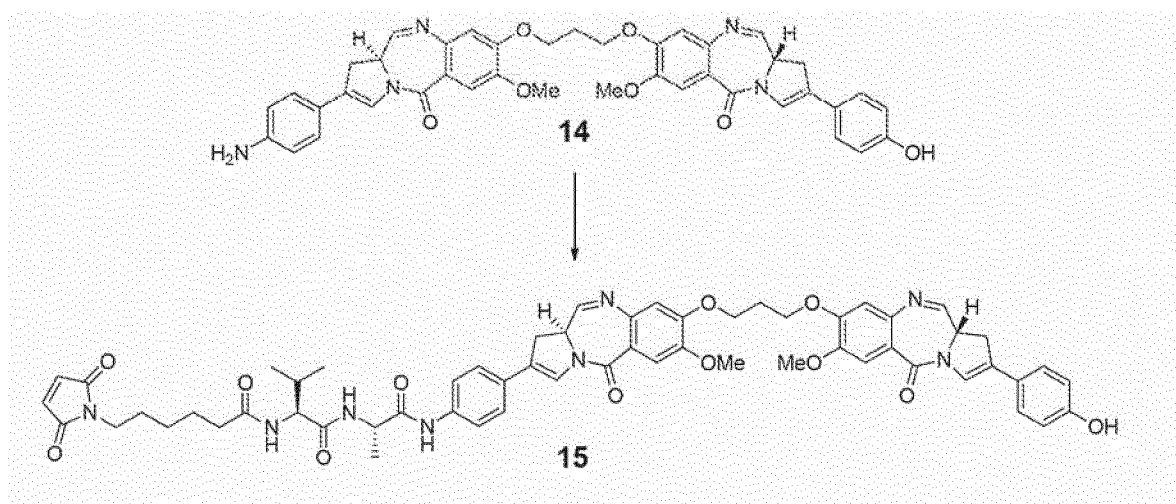
tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H,11aH)-diona (13)

Un matraz se cargó con anilina triflato **12** (compuesto 9, documento WO 2011/130613 A1) (520 mg, 490 μ mol, 1 eq.) disuelta en tolueno (5,4 ml), etanol (2,7 ml), y agua (2,7 ml). A la solución agitada se añadió ácido 4-hidroxifenilborónico (88 mg, 640 μ mol, 1,3 eq), carbonato de sodio (83 mg, 780 μ mol, 1,6 eq), y tetraquis(trifenilfosfina) paladio(0) (23 mg, 20 μ mol, 0,04 eq), la reacción se agitó vigorosamente durante una noche a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de 22 horas la reacción se había estancado. Se añadió tetraquis(trifenilfosfina) paladio (0) (100 mg, 87 μ mol, 0,18 eq) y ácido 4-hidroxifenilborónico (88 mg, 640 μ mol, 1,3 eq) adicional y la reacción se agitó a 35 °C durante 24 horas adicionales, momento en el cual CL/EM reveló la conversión en producto. La reacción se concentró y después se repartió entre acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (100 ml). A continuación, la capa orgánica se lavó con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad para proporcionar dilactama SEM 13 bruta. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con mezclas de hexanos:acetato de etilo (75:25 a 0:100), para proporcionar el producto puro **13** (218 mg, 44 %), CL-EM: t_R 11,54 min, m/z (ES^+) observado 1004,3 ($M+H^+$). 1H RMN ($CDCl_3$) δ (ppm) 0,02 (s, 18H), 0,98 (m, 4H), 2,44 (m, 2H), 3,12 (m, 2H), 3,67 (m, 3H), 3,77 (m, 4H), 3,91 (m, 8H), 4,29 (t, $J = 5,9$ Hz, 4H), 4,59 (dt, $J = 3,1, 10,2$ Hz, 2H), 4,76 (dd, $J = 3,1, 10,2$ Hz, 2H), 5,52 (d, $J = 10,2$ Hz, 2H), 6,34 (sa, 1H), 6,66 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 6,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,22 (m, 4H), 7,27 (m, 6H), 7,39 (s, 2H).

(b) *(S)-2-(4-aminofenil)-8-(3-(((S)-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (14)*

Un matraz secado a la llama se cargó con dilactama SEM 13 (109 mg, 109 μ mol, 1 eq) disuelta en tetrahidrofurano anhidro (2,2 ml), y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota trietilborohidruro de litio (0,33 ml de una solución 1 M en THF, 330 μ mol, 3 eq.) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2,5 horas, momento en el cual CL reveló una conversión incompleta en producto. Se añadieron 0,66 ml adicionales de reductor y la reacción se agitó durante una hora más. La reacción se interrumpió a través de la adición de agua (1 ml) y se dejó calentar a temperatura ambiente, después se diluyó con salmuera (25 ml) y se extrajo tres veces con diclorometano (25 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (25 ml), se secó sobre sulfato de sodio, y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en una mezcla de diclorometano (2,8 ml), etanol (7,4 ml), y agua (1,0 ml), y se añadió gel de sílice (2,7 g). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El análisis de CCF reveló la conversión a dímero de imina **14**, momento en el cual la suspensión se filtró sobre un embudo de vidrio sinterizado y la torta de gel de sílice se lavó con metanol al 10 % en cloroformo hasta que no se observó más absorbancia de PBD en el filtrado. La concentración del filtrado proporcionó el dímero imina bruto **14**. El material se disolvió en diclorometano mínimo y se purificó por cromatografía radial sobre una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas $CH_2Cl_2/MeOH$ (100:0 a 80:20) para proporcionar **14** (31 mg, 40 %). CL-EM: t_R 8,48 min, m/z (ES^+) observado 712,2 ($M+H^+$).

40 Ejemplo 5



6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (15)

Un matraz secado a la llama se cargó con enlazador maleimidocaproil-valina-alanina (compuesto 36 del Ejemplo 13 en el documento WO 2011/130613 A1) (11 mg, 29 μ mol, 1,5 eq) disuelto en 0,8 ml de metanol al 5 % en

diclorometano anhidro. El ácido fue activado previamente mediante la adición de N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (9 mg, 34 μmol , 1,8 eq), seguido de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno durante 15 minutos. A continuación, se añadió el ácido activado a un matraz secado a la llama que contiene el dímero PBD **14** (13 mg, 19 μmol , 1 eq). La reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno, momento en el cual CL-EM reveló la conversión en producto. El material se diluyó en diclorometano y se purificó por cromatografía radial sobre una placa de cromatotrón de 1 mm eluída con mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 80:20) para proporcionar **15** (7,7 mg, 38 %). CL-EM: m/z (ES^+) observado 1075,5 (M+H)⁺.

Ejemplo 6 - preparación de conjugados de dímeros de PBD

Los anticuerpos con cisteínas introducidas: Los anticuerpos frente a CD70 que contiene un residuo de cisteína en la posición 239 de la cadena pesada fueron totalmente reducidos mediante la adición de 10 equivalentes de TCEP y EDTA 1 mM y ajustando el pH a 7,4 con tampón Tris 1 M (pH 9,0). Después de una incubación de 1 hora a 37 °C, la reacción se enfrió a 22 °C y se añadieron 30 equivalentes de ácido deshidroascórbico para reoxidar selectivamente los disulfuros nativos, mientras que deja la cisteína 239 en el estado reducido. El pH se ajustó a 6,5 con tampón Tris 1 M (pH 3,7) y la reacción se dejó avanzar durante 1 hora a 22 °C. El pH de la solución se elevó entonces de nuevo a 7,4 mediante la adición de tampón Tris 1 M (pH 9,0). 3,5 equivalentes del enlazador de fármaco PBD en DMSO se colocaron en un recipiente adecuado para la dilución con propilenglicol antes de la adición a la reacción. Para mantener la solubilidad del enlazador de fármaco PBD, el anticuerpo en sí se diluyó primero con propilenglicol hasta una concentración final de 33 % (p. ej., si la solución de anticuerpo estaba en un volumen de reacción de 60 ml, se añadió 30 ml de propilenglicol). A continuación se añadió este mismo volumen de propilenglicol (30 ml en este ejemplo) al enlazador de fármaco PBD como diluyente. Después de mezclar, se añadió la solución del enlazador de fármaco PBD en propilenglicol a la disolución de anticuerpo para efectuar la conjugación; la concentración final de propilenglicol es del 50 %. La reacción se dejó avanzar durante 30 minutos y después se inactivó mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El CAF se purificó después por ultrafiltración a través de una membrana de 30 kD. (Tenga en cuenta que la concentración de propilenglicol usada en la reacción puede reducirse para cualquier PBD especial, ya que su único fin es mantener la solubilidad del enlazador de fármaco en el medio acuoso).

Ejemplo 7 - Determinación de la citotoxicidad *in vitro* del fármaco libre

Las células que se detallan a continuación se recogieron y se sembraron en placas de lados negros de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en 150 μl de medio. Se añadieron diluciones en serie del artículo de ensayo (50 μl), y la incubación se llevó a cabo durante 92 horas a 37 °C. Después de la adición del compuesto de ensayo, los cultivos se incubaron a 96 horas a 37 °C. Se añadió resazurina (0,25 mM, 50 μl , Sigma, St. Louis, MO) en el medio y la incubación continuó durante 4 horas. Las placas se leyeron en un lector de fusión HT de microplacas (Packard, Meriden, Conn.) usando una longitud de onda de excitación de 525 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los datos de todos los ensayos se redujeron usando GraphPad Prism Versión 4 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Las concentraciones CI_{50} se compararon con las células de control sin tratar y se determinaron usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

Los valores IC_{50} (pM) para los compuestos 4 y 14:

Tabla 1 - IC_{50} en pM después de un tratamiento de 48 horas

Compuesto	786-O	Caki-1	HL60	HEL9217
4	50	20	8	8
14	200	400	30	50

Ejemplo 8: Determinación de la actividad *in vitro* de conjugados seleccionados

La actividad citotóxica *in vitro* de los conjugados de fármacos de anticuerpos seleccionados se evaluó usando un ensayo de reducción de resazurina (Sigma, St. Louis, Mo., EE.UU.) (Referencia. Doronina y col., Nature Biotechnology, 2003, 21.778-784). Los conjugados de fármacos de anticuerpos se prepararon como se describe anteriormente en el Ejemplo 6.

Para el ensayo de 96 horas, se sembraron las células cultivadas en crecimiento en fase logarítmica durante 24 horas en placas de 96 pocillos que contenían 150 μl de RPMI 1640 suplementado con 20 % de SFB. Se prepararon diluciones en serie de CAF en medios de cultivo de células en concentración de trabajo 4x; 50 μl de cada dilución se añadió a las placas de 96 pocillos. Después de la adición de CAF, las células se incubaron con artículos de ensayo durante 4 días a 37 °C. La resazurina se añadió entonces a cada pocillo para conseguir una concentración final de 50 μM , y las placas se incubaron durante 4 horas adicionales a 37 °C. Las placas se leyeron entonces para la extensión de la reducción del colorante en un lector de placa de fusión HT (Packard Instruments, Meriden, Conn., EE.UU.) con longitud de onda de excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente. El valor IC_{50} , determinado por triplicado, se define en este caso como la concentración que da como resultado una reducción del 50 % en el crecimiento celular relativo a los controles no tratados.

Haciendo referencia a las tablas a continuación, se muestra la citotoxicidad *in vitro* de los CAF usando el ensayo de 96 horas. Los CAF se ensayaron frente a líneas celulares de antígeno positivas y negativas.

Tabla 2 - IC50 en pM después de un tratamiento de 96 horas

CAF	Fármacos/Ab	786-O	Caki-1	línea celular de antígeno negativa
h1F6ec-6	1,8	30	0,1	90.000
h1F6ec-11	1,8	50	30	Sin efecto
h1F6ec-15	2,0	30	13	10.000

5

Ejemplo 9: Determinación de la citotoxicidad *in vivo* de conjugados seleccionados

Se llevaron a cabo todos los estudios, de acuerdo con el Comité de cuidado y uso de animales en una instalación que está totalmente acreditada por la Asociación para la evaluación y acreditación de cuidado de animales de laboratorio. La tolerabilidad CAF se evaluó primero para asegurar que los conjugados eran tolerados en las dosis seleccionadas para los experimentos de xenoinjerto. Los ratones BALB /c fueron tratados con dosis crecientes de CAF formulado en PBS con arginina 0,5 M y 0,01 % de Tween 20. Los ratones se controlaron para la pérdida de peso y los signos externos de morbilidad después del tratamiento; los que experimentaron una pérdida de peso mayor que 20 % o mostraron signos de morbilidad fueron sacrificados. El anticuerpo usado era un anticuerpo CD70, h1F6 humanizado (documento WO2006/113909), con una mutación puntual que sustituye la cisteína por la serina en la posición 239. La conjugación con la unidad de fármaco es a través de la cisteína introducida en la posición 239. Un promedio de 2 fármacos se carga por anticuerpo.

Los experimentos de terapia *in vivo* se llevaron a cabo en modelos de xenoinjerto en ratones portadores de carcinoma de células renales CD70+ o el linfoma no Hodgkin. Los fragmentos de tumor se implantaron en ratones atímicos. A continuación los ratones fueron aleatorizados a grupos de estudio con un promedio de cada grupo de alrededor de 100 mm³. Los CAF se administraron de acuerdo con el calendario indicado. El volumen del tumor como una función del tiempo se determinó usando la fórmula (L x W²)/2. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzaba 1000 mm³. Los ratones que muestran regresiones duraderas se terminaron alrededor del día 100 después del implante.

La Figura 1 muestra los resultados de los estudios de tratamiento usando h1F6ec-compuesto 6 en carcinoma de células renales CD70+ (786-O), con dosis única dada de IP. En la figura, ✖ está sin tratar, ● es el tratamiento con h1F6ec-6 a 0,03 mg/kg y ○ es el tratamiento con h1F6ec-6 a 0,1 mg/kg.

La Figura 2 muestra los resultados de los estudios de tratamiento usando h1F6ec-compuesto 6 en el linfoma no Hodgkin (MHHPreB1), con la dosificación q7dx2. En la figura, ✖ está sin tratar y ● es el tratamiento con h1F6ec-6 a 0,1 mg/kg.

Los resultados de un experimento de tolerabilidad en ratones con h1F6ec-6 nominalmente cargada en 2 fármacos/mAb demostraron que una sola dosis de 1 mg/kg fue bien tolerado con ninguna pérdida de peso o signos de morbilidad hacia el exterior a 30 días. La administración de una dosis más alta (2,5 mg/kg) dio como resultado la pérdida de peso.

Los valores IC₅₀ (nM) para los CAF con el compuesto 6:

CAF	línea celular de cáncer 786-O	línea celular de cáncer Caki-1	Línea celular de cáncer negativa CD70	Línea celular de cáncer negativa CD70	Línea celular de cáncer negativa CD70
h1F6ec-6 (1,8dr/Ab)	1	0,5	7491	2074	5327

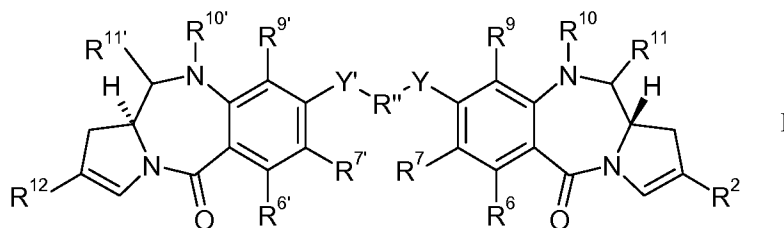
Los valores IC₅₀ (nM) para los CAF con el compuesto 6 y el compuesto 11:

CAF	Línea celular de cáncer 786-0	línea celular de cáncer Caki-1	Línea celular de cáncer negativa CD70	Línea celular de cáncer negativa CD70	Línea celular de cáncer negativa CD70
h1F6ec-11 (1,8dr/Ab)	4	2	Sin efecto	7725	Max Inh=50 %
h1F6ec-6 (1,8dr/Ab)	2	0,01	7215	1415	Max Inh=45 %

45

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con la fórmula I:

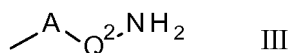


5

en la que:

R² es de fórmula III:

10



en la que A es fenilo y Q² se selecciona entre un enlace sencillo y -CH₂;
R¹² es fenilo, sustituido con un grupo seleccionado entre OH, CO₂H y CO₂Me;
R⁶, R^{6'}, R⁹ y R^{9'} son H;
R⁷ es un alquiloxi C₁₋₄ y:

15

- (a) R¹⁰ es H, y R¹¹ es OH, OR^A, en donde R^A es alquilo C₁₋₄; o
- (b) R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos;

20

Rⁿ es un grupo alquilenos C₃₋₇;

Y e Y' son O;

R⁷ se selecciona entre los mismos grupos que R⁷ y R¹⁰; y R¹¹, son iguales que R¹⁰ y R¹¹, en donde el término alquilo incluye las subclases alqueno, alquino y cicloalquilo, y el término alquilenos incluye las subclases alquilenos, alquilenos y cicloalquilenos.

25

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Q² es un enlace sencillo.

30

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Q² es CH₂.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en: 4-hidroxifenilo, 3-hidroxifenilo, 4-carboxi-fenilo, 3-carboxi-fenilo, 4-metiloxycarbonil-fenilo y 3-metiloxycarbonil-fenilo.

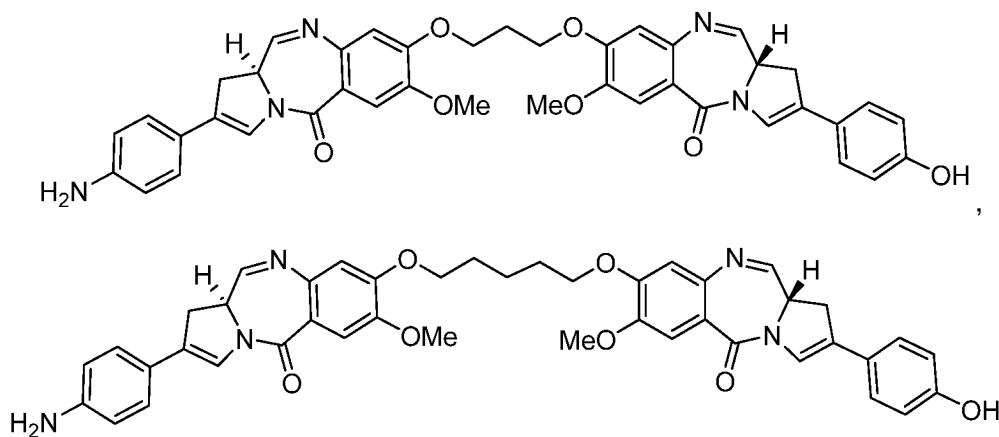
35

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace de nitrógeno-carbono.

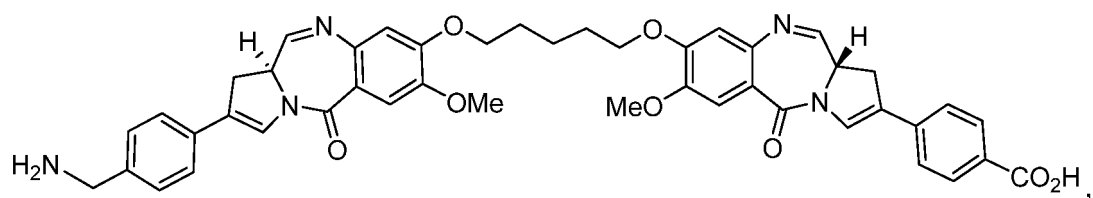
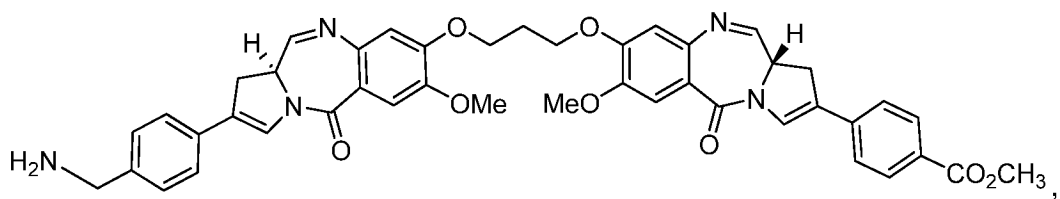
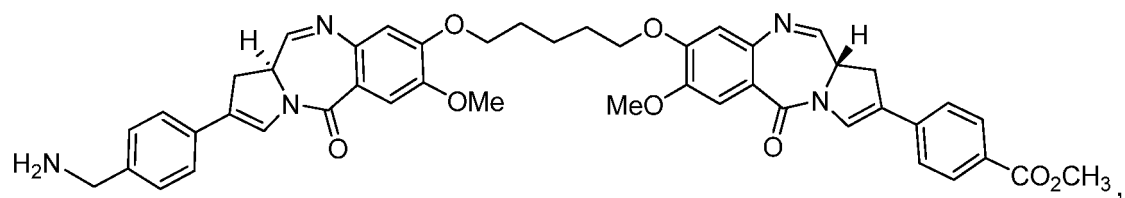
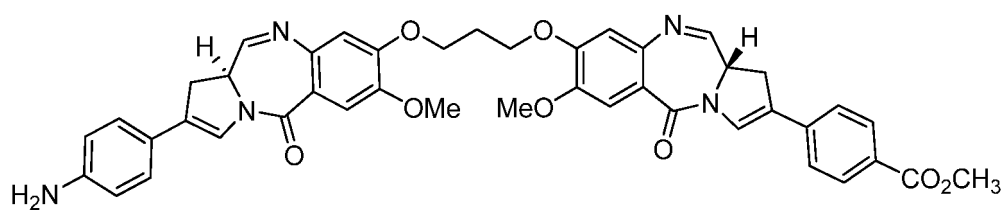
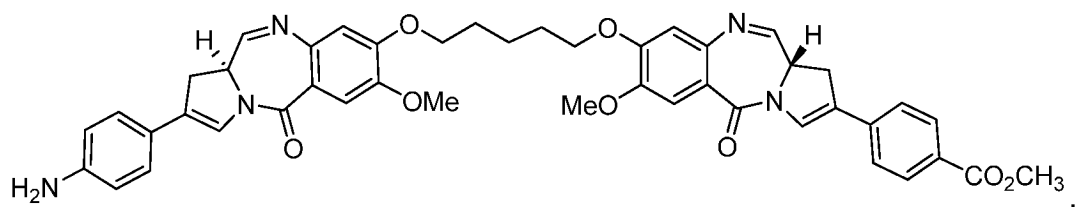
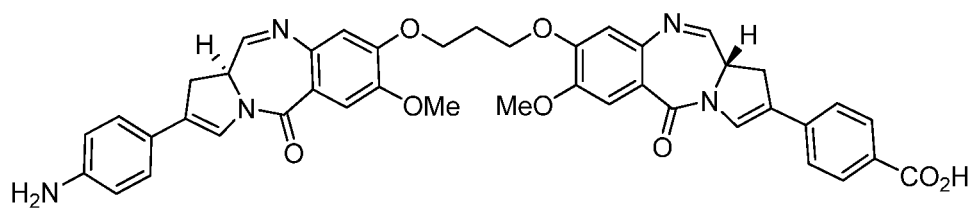
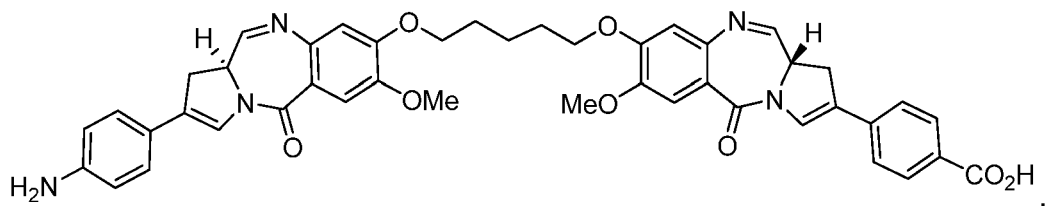
6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde R⁷ es igual que R⁷.

40

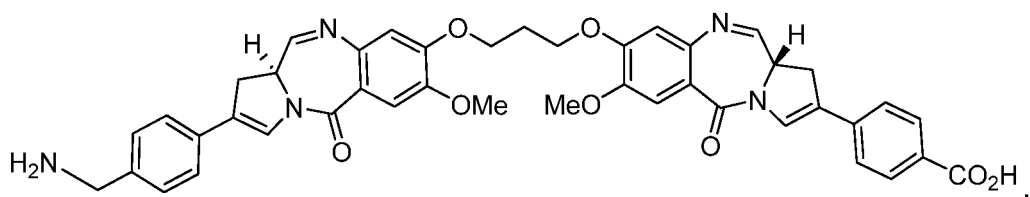
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en:



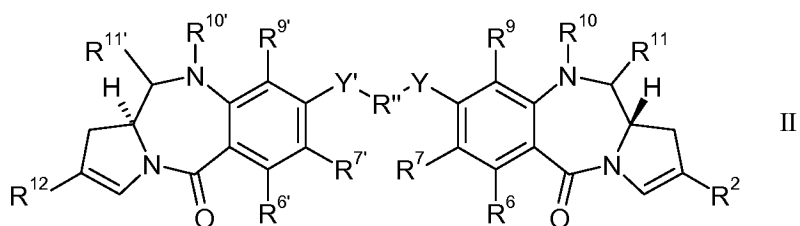
45



y



8. Un compuesto de fórmula II:



5

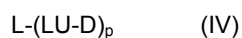
en la que:

10 R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , Y , R'' , Y' , R^{12} , R^6 , R^7 , y R^9 son como se definen para un compuesto de fórmula I en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y bien:

- (a) R^{10} es 2,2,2-tricloretoxicarbonilo y R^{11} es O-terc-butildimetilsililo; o
- (b) R^{10} es [2-(trimetilsilil)etoxi]metilo y R^{11} es un grupo oxo

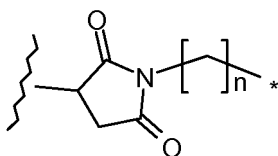
15 y $R^{10'}$ y $R^{11'}$ son iguales que R^{10} y R^{11} .

9. Un conjugado que tiene la fórmula IV:



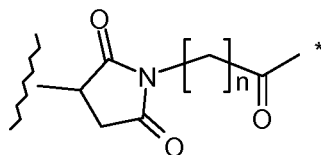
20

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de la misma; en donde L es una unidad de ligando seleccionada entre un anticuerpo y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, LU es una unidad de enlazador que es $-A^1-L^1-$, en la que A^1 se selecciona entre:



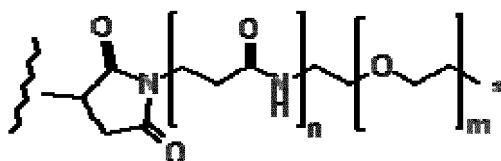
25

en la que n es 0 a 6;



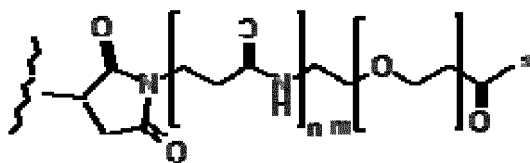
30

en la que n es 0 a 6;



35

en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30 o



en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30,

y en donde en los grupos A¹ anteriores, el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando,

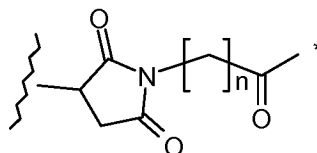
L¹ comprende una secuencia de aminoácido que es escindible mediante la acción de una enzima;

p es de 1 a 20 y

D es una unidad de fármaco que es un dímero de PBD de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,

en donde LU está conectado a D a través del sustituyente amino de R².

10. El conjugado de la reivindicación 9, en el que A¹ es:



en donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 5.

11. El conjugado de las reivindicaciones 9 o 10, en donde L¹ es un dipéptido, que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en valina-alanina, valina-citrulina y fenilalanina-lisina.

12. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o de una enfermedad autoinmune.

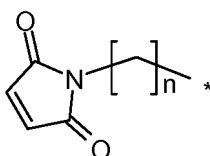
13. El conjugado de la reivindicación 12, en donde el cáncer es una malignidad hematológica; tal como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkin, y subtipos tales como LDCGB, zona marginal, zona del manto y folículo, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen de células B o T.

14. El conjugado de la reivindicación 12, en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer microcítico de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi o melanoma.

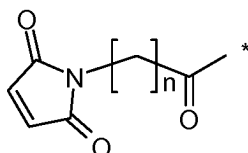
15. Un enlazador de fármaco de fórmula V:



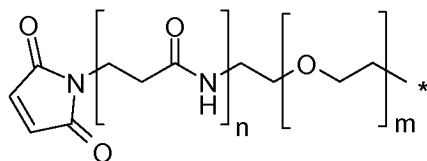
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde LU es una unidad de enlazador que es G¹-L¹, en la que G¹ se selecciona entre:



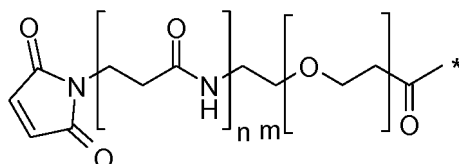
en la que n es 0 a 6;



en la que n es 0 a 6;



5 en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30;



10 en la que n es 0 o 1 y m es 0 a 30;
 y en donde en los grupos G^1 anteriores, el asterisco indica el punto de unión a L^1 y L^1 , comprende una secuencia de aminoácidos que es escindible mediante la acción de una enzima, y D es una unidad de fármaco que es un dímero de PBD de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, estando LU conectado a D a través del sustituyente amino de R^2 .

15

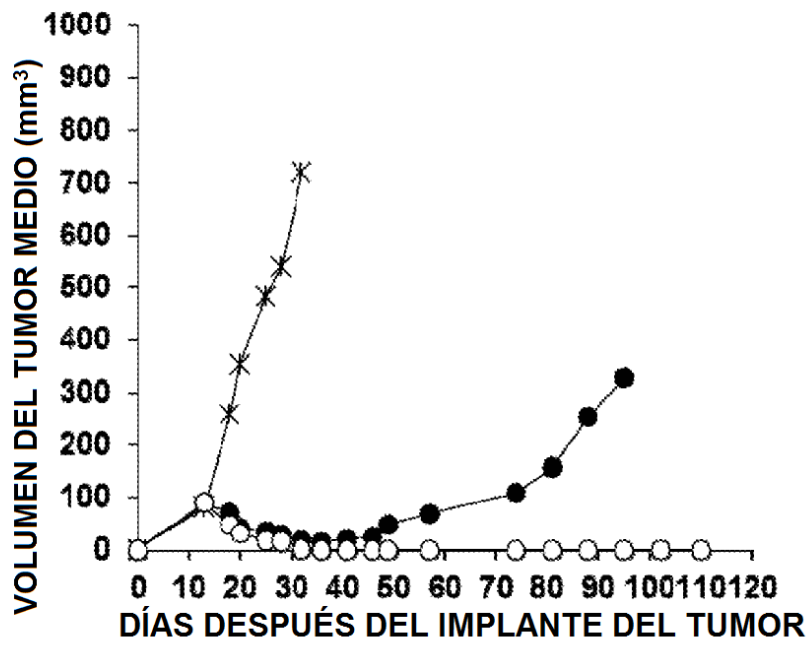


Fig. 1

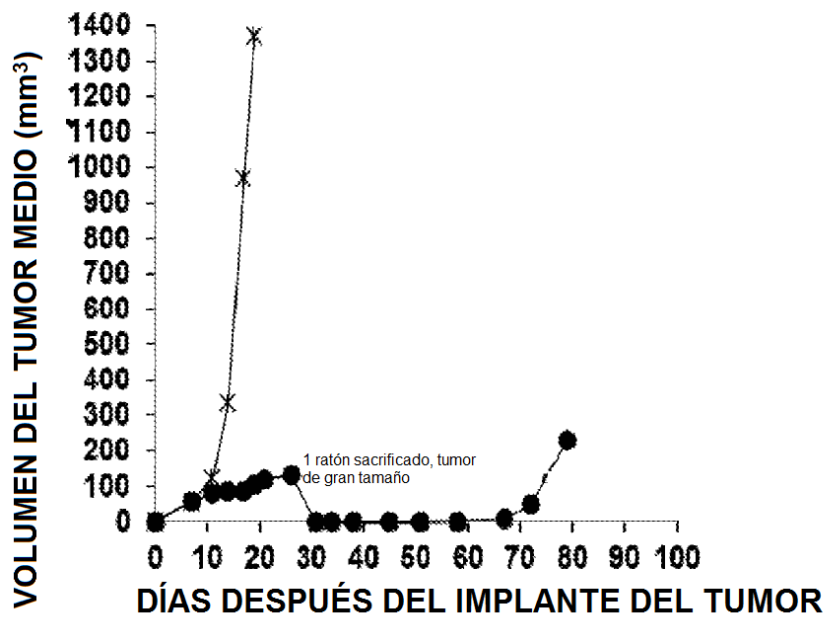


Fig. 2