

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 246**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012 PCT/US2012/059867**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012 E 12840661 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2755642**

54 Título: **Pirrolobenzodiazepinas y conjugados dirigidos**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547192 P

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

24.10.2018

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 2 687 246 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

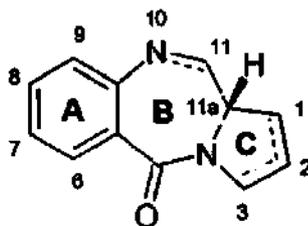
Pirrolobenzodiazepinas y conjugados dirigidos

5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular a 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 PuGPy. El primer antibiótico antitumoral de PBD, antramycin, se descubrió en 1965 (Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se han presentado numerosos PBD de origen natural, y se han desarrollado numerosas
 15 rutas de síntesis para obtener varios análogos (Thurston, et al., *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, et al., *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)), quicamicina (Konishi, et al., *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Patente japonesa 58-180 487; Thurston, et al., *Chem. Brit.*, 26.767-772 (1990); Bose, et al., *Tetrahedron*, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, et al., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, et al., *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)), protramicina (Tsunakawa, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, et al., *J. Antibiotics*, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, et al., *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, et al., *J. Antibiotics*, 25, 437-444 (1972)). Las PBD tienen la estructura general:

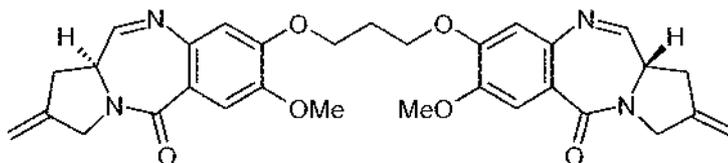
25



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 levógiro 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, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 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.

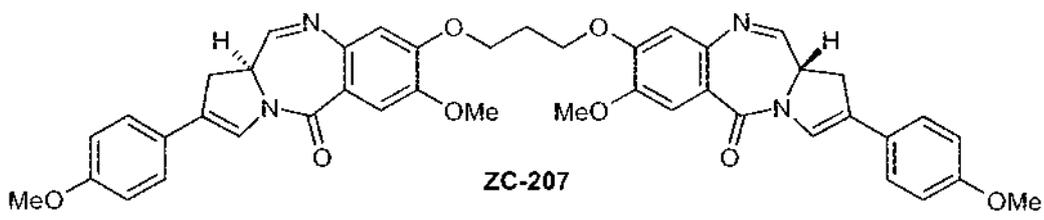
40 Se ha divulgado anteriormente que la actividad biológica de estas moléculas se puede potenciar uniendo dos unidades PBD entre sí a través de sus funcionalidades C8/C'-hidroxilo a través de un enlazador de alqueno flexible (Bose, DS, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4939-4941 (1992); Thurston, DE, et al., *J. Org. Chem.*, 61, 8141-8147 (1996)). Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones en el ADN selectivas de la secuencia tal como el enlace cruzado 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómico entre cadenas (Smellie, M., et al., *Biochemistry*, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., *Biochemistry*, 44, 4135-4147) que se cree que es el principal responsable de su actividad biológica. Un ejemplo de un dímero de PBD, SG2000 (SJJ-136):

45

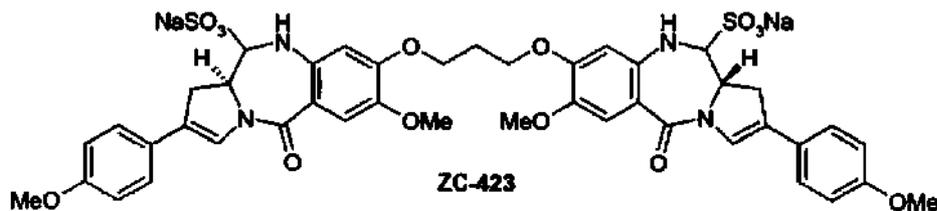


50 ha entrado recientemente en ensayos clínicos de fase II en el área de oncología (Gregson, S., et al., *J. Med. Chem.*, 44, 737-748 (2001); Alley, MC, et al., *Cancer Research*, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, JA, et al., *Cancer Research*, 64, 6693-6699 (2004)).

Más recientemente, los presentes inventores han divulgado previamente, en el documento WO 2005/085251, compuestos de PBD dímeros que tienen sustituyentes de arilo en 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, *et al.*, *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, bien 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 divulga un compuesto de PBD dímérico que tiene grupos arilo en la posición C2 de cada monómero, donde uno de estos grupos arilo tiene 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 presente, presentada el 15 de abril de 2011, divulga la inclusión de estos compuestos dímicos de PBD en conjugados dirigidos.

20

Divulgación de la invención

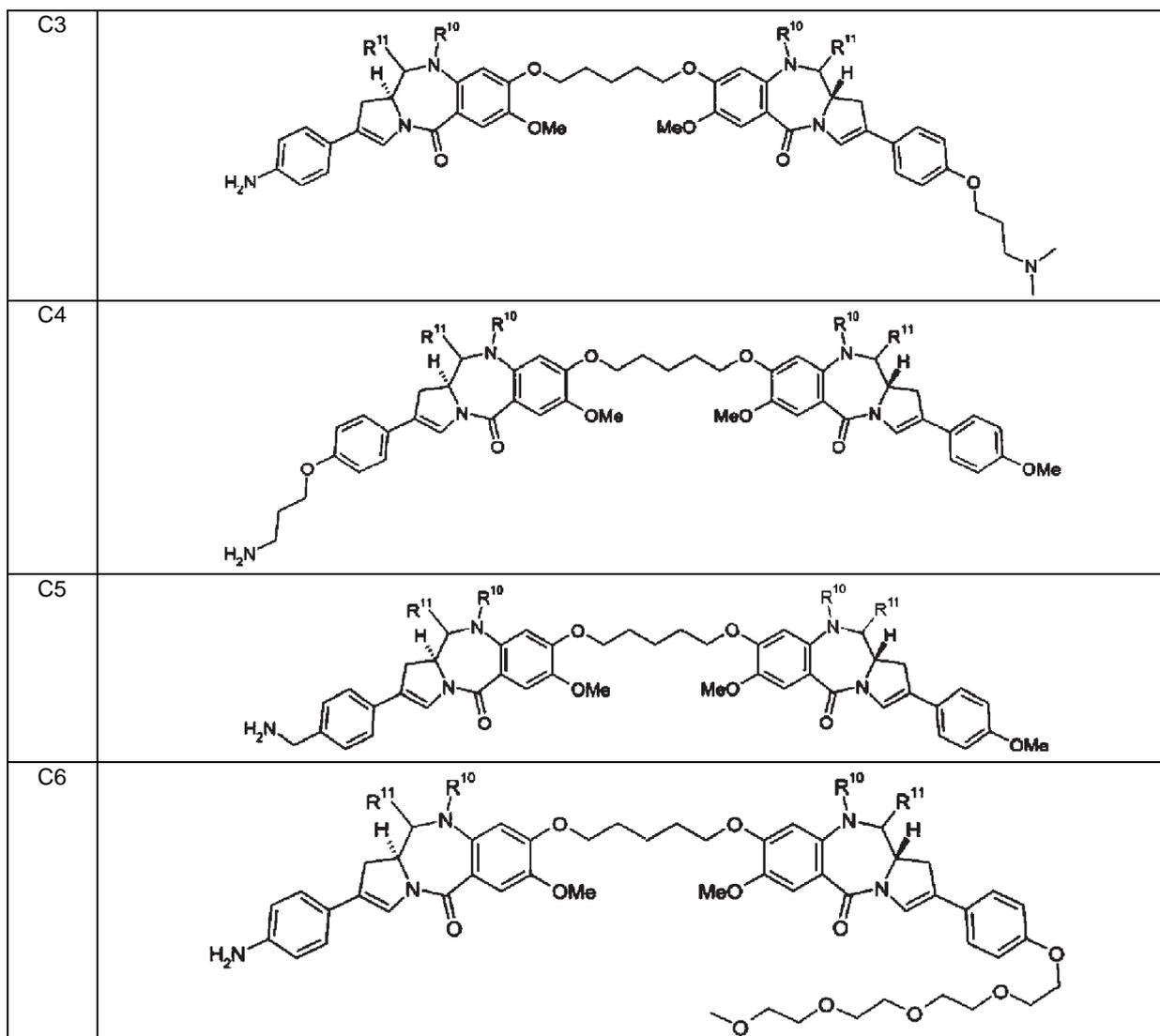
Los presentes inventores han desarrollado compuestos de PBD dímicos no asimétricos adicionales específicos para su inclusión en conjugados dirigidos. Estos compuestos pueden tener ventajas en su preparación y uso, particularmente en sus propiedades biológicas y la síntesis de conjugados, y las propiedades biológicas de estos conjugados.

25

La presente invención comprende un compuesto, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre el grupo que consiste en:

30

C1	
C2	



en la que cualquiera de

- 5 (a) R^{10} es H, y R^{11} es OH u OR^A , donde R^A es alquilo saturado; 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; o
 (c) R^{10} es H y R^{11} es SO_2M , donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable, o ambos M conjuntamente son un catión divalente farmacéuticamente aceptable.

10 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 siguientes.

15 Un segundo aspecto de la presente invención comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención, salvo donde cualquiera de:

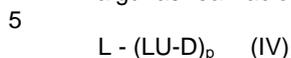
- 20 (a) R^{10} es un grupo carbamato protector de nitrógeno, y R^{11} es $O-Prot^O$, en la que $Prot^O$ es un grupo protector de oxígeno; o
 (b) R^{10} es un grupo protector de nitrógeno hemiaminal y R^{11} es un grupo oxo.

Los compuestos diméricos de PBD asimétricos de la presente invención se preparan según estrategias diferentes a las anteriormente utilizadas para fabricar compuesto diméricos de PBD simétricos. En particular, los presentes inventores han desarrollado un método que implica añadir cada sustituyente de C2 a un núcleo de PBD dimérico en etapas del proceso independientes.

25 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a conjugados que comprenden dímeros de PBD unidos a un

agente de direccionamiento, en el que el dímero de PBD es un compuesto como se describe en el presente documento, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo (más arriba).

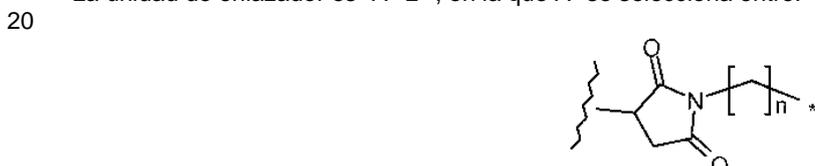
En algunas realizaciones, los Conjugados tienen la siguiente fórmula IV:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que L es una unidad de ligando (es decir, un agente de direccionamiento), 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 un 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 direccionamiento 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 una enfermedad autoinmunitaria.

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

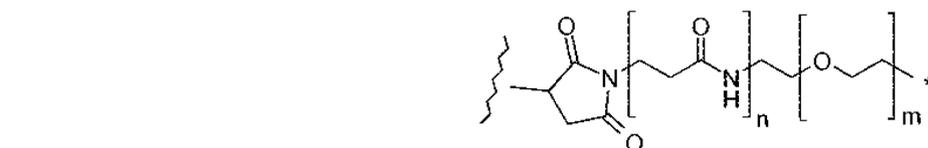
La unidad de enlazador es -A¹-L¹-, en la que A¹ se selecciona entre:



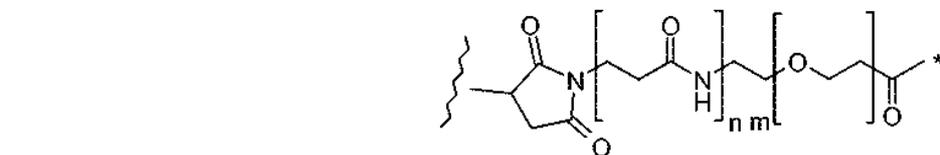
donde n es de 0 a 6;



donde n es de 0 a 6;



donde n es 0 o 1 y m es de 0 a 30;



donde es 0 o 1 y m es de 0 a 30, L¹ comprende una secuencia de aminoácidos que se puede escindir mediante la acción de una enzima, y donde en los grupos A¹ anteriores, el asterisco indica el punto de unión a L¹, y la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando.

40 En los conjugados de la presente invención, el dímero de PBD, D, se selecciona entre el grupo que consiste en:

La carga del fármaco está representada por p, el número de moléculas de fármaco por unidad de ligando (por ejemplo, un anticuerpo). La carga de fármaco puede oscilar entre 1 y 20 unidades de fármaco (D) por unidad de ligando (por ejemplo, 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.

5 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 de 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.

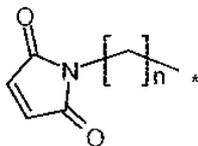
15 El número promedio de unidades de fármaco por unidad de ligando en una preparación procedente de una reacción de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los conjugados en función de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados homogéneos, donde p tiene un valor determinado, a partir de conjugados con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

20 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 direccionamiento.

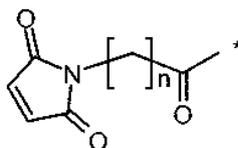
25 Estos enlazadores de fármaco tienen la siguiente fórmula V:



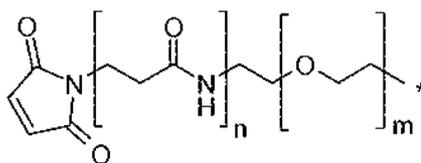
30 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que LU es una unidad de enlazador y D es una unidad de fármaco que es un dímero de PBD, como se define en el tercer aspecto de la invención. La unidad de enlazador es G¹-L¹, en la que G¹ se selecciona entre:



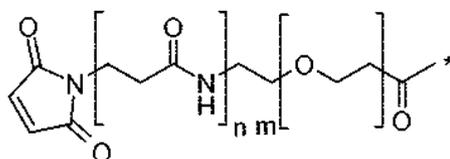
35 donde n es de 0 a 6;



40 donde n es de 0 a 6;



donde es 0 o 1 y m es de 0 a 30;



45

donde es 0 o 1 y m es de 0 a 30,

L^1 comprende una secuencia de aminoácidos que se puede escindir mediante la acción de una enzima, y donde, en los grupos G^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.

5

Figuras

La Figura 1 muestra el efecto sobre el volumen tumoral medio después del tratamiento con dos conjugados de la presente invención.

10

Definiciones

Cationes farmacéuticamente aceptables

15 Ejemplos de cationes monovalentes y divalentes farmacéuticamente aceptables se tratan en Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

El catión farmacéuticamente aceptable puede ser inorgánico u orgánico.

20 Ejemplos de cationes monovalentes inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, iones de metales alcalinos 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, ion amonio (es decir NH_4^+) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son los procedentes de: etilamina, dietilamina, dicitlohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es $N(CH_3)_4^+$.

25

Grupos

30

El término "alquilo C_{1-4} saturado", 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. De manera similar, el término "alquilo C_{1-2} saturado", 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.

35

Ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C_1), etilo (C_2), propilo (C_3), y butilo (C_4).

40 Ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, pero sin limitación, metilo (C_1), etilo (C_2), n-propilo (C_3) y n-butilo (C_4).

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

45

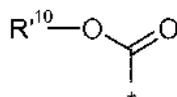
Oxo (ceto, -ona): =O.

Grupo protector de oxígeno: el término "grupo protector de oxígeno" se refiere a un resto que enmascara un grupo hidroxilo, y estos son bien conocidos en la técnica. Un importante número de grupos adecuados se describe en las páginas 23 a 200 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

50

Las clases de especial interés incluyen éteres de sililo (por ejemplo, TMS, TBDMS), éteres de metilo (por ejemplo, THP) y ésteres de metilo (por ejemplo, acetato) sustituidos.

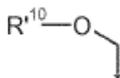
55 Carbamato como grupo protector de nitrógeno: el término "carbamato como grupo protector de nitrógeno" se refiere a un resto que enmascara el átomo de nitrógeno del enlace imina, y estos son bien conocidos en la técnica. Estos grupos tienen la siguiente estructura:



60

en la que R^{10} es R como se define a continuación. Un importante número de grupos adecuados se describe en las páginas 503 a 549 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Grupo protector de nitrógeno hemiaminal: el término "grupo protector de nitrógeno hemiaminal" se refiere a un grupo que tiene la siguiente estructura:



5 en la que R^{10} es R como se define a continuación. Un importante número de grupos protectores adecuados se describe en las páginas 633 a 647 como grupos protectores de amida en Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

10 R

R se selecciona entre grupos alquilo C_{1-12} , heterociclilo C_{3-20} y arilo C_{5-20} opcionalmente sustituidos.

15 La expresión "opcionalmente sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que puede estar no sustituido o que puede estar sustituido.

20 Salvo que se especifique otra cosa, el término "sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que tiene 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, condensado con, un grupo precursor. Se conocen bien una amplia diversidad de sustituyentes, y también son bien conocidos los métodos para su formación e introducción en diversos grupos principales.

Ejemplos de sustituyentes se describen con más detalle a continuación.

25 alquilo C_{1-12} : El término "alquilo C_{1-12} " 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 12 átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, y que puede estar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, completamente insaturado). El término "alquilo C_{1-4} " 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 estar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, completamente insaturado). De manera similar, el término "alquilo C_{1-2} " 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.

35 Por tanto, el término "alquilo" incluye las subclases alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, etc., tratadas a continuación.

40 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).

45 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).

Alquenilo C_{2-12} : El término "alquenilo C_{2-12} " como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

50 Ejemplos de grupos alquenilo insaturados incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo, $-CH=CH_2$), 1-propenilo ($-CH=CH-CH_3$), 2-propenilo (alilo, $-CH=CH-CH_2$), isopropenilo (1-metilvinilo, $-C(CH_3)=CH_2$), butenilo (C_4), pentenilo (C_5) y hexenilo (C_6).

55 Alquinilo C_{2-12} : El término "alquinilo C_{2-12} " 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 alquinilo insaturados incluyen, pero sin limitación, etinilo ($-C\equiv CH$) y 2-propinilo (propargilo, $-CH_2-C\equiv CH$).

60 *Cicloalquilo* C_{3-12} : El término "cicloalquilo C_{3-12} " como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que también es un grupo ciclilo; es decir, un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del 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.

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

compuestos de hidrocarburos monocíclicos saturados:

5 ciclopropano (C₃), ciclobutano (C₄), ciclopentano (C₅), ciclohexano (C₆), cicloheptano (C₇), metilciclopropano (C₄), dimetilciclopropano (C₅), metilciclobutano (C₅), dimetilciclobutano (C₆), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) y metilciclohexano (C₇);

compuestos de hidrocarburo monocíclico insaturado:

10 ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), ciclohexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) y metilciclohexeno (C₇); y

compuestos de hidrocarburo policíclico saturado:

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

15 Heterociclilo C₃₋₂₀: El término "heterociclilo C₃₋₂₀" 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 heterocíclico, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, de los que de 1 a 10 son heteroátomos del anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los que de 1 a 4 son heteroátomos del anillo.

20 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) denotan el número de átomos en el anillo, o un intervalo del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término "heterociclilo C₅₋₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

Ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, los procedentes de:

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

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

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

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

O₃: trioxano (C₆);

35 N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (dihidropirazol) (C₅), piperazina (C₆);

N₁O₁: tetrahidrooxazol (C₅), dihidrooxazol (C₅), tetrahidroisoxazol (C₅), dihidroisoxazol (C₆), morfolina (C₆), tetrahidrooxazina (C₆), dihidrooxazina (C₆), oxazina (C₆);

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

40 N₂O₁: oxadiazina (C₆);

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

N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

45 Ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen los obtenidos a partir de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C₅), tales como arabinofuranosa, lixofuranosa, ribofuranosa, y xilofuranosa, y piranosas (C₆), tales como alopiranosa, altropiranosa, glucopiranosa, mannopiranosa, gulopiranosa, idopiranosa, galactopiranosa, y talopiranosa.

50 arilo C₅₋₂₀: El término "arilo C₅₋₂₀", 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 anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos en el anillo. El término "arilo C₅₋₇", 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 anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 5 a 7 átomos en el anillo y el término "arilo C₅₋₁₀", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la

55 eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 5 a 10 átomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo.

60 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀, etc.) denotan el número de átomos en el anillo, o un intervalo del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término "arilo C₅₋₆", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

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

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

65 Ejemplos de grupos arilo que comprenden anillos condensados, al menos uno de los cuales es un anillo aromático,

incluyen, pero sin limitación, grupos obtenidos a partir de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C₉), indeno (C₉), isoindeno (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (C₁₀), acenafteno (C₁₂), fluoreno (C₁₃), fenaleno (C₁₃), acefenantreno (C₁₅), y aceantreno (C₁₆).

- 5 Como alternativa, los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en "grupos heteroarilo". Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, pero sin limitación, los procedentes de:

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

O₁: furano (oxol) (C₅);

10 S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

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

N₂O₁: oxadiazol (furazano) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

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

N₃: triazol (C₅), triazina (C₆); y,

N₄: tetrazol (C₅).

- 20 Ejemplos de heteroarilo que comprenden anillos condensados, incluyen, aunque sin limitación:

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

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

30 C₁₁ (con 2 anillos condensados) procedente de benzodiazepina (N₂);

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

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

35 Los grupos anteriores, tanto solos o como parte de otro sustituyente, pueden estar ellos mismos opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre ellos mismos y los sustituyentes adicionales relacionados a continuación.

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

Hidroxi: -OH.

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

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

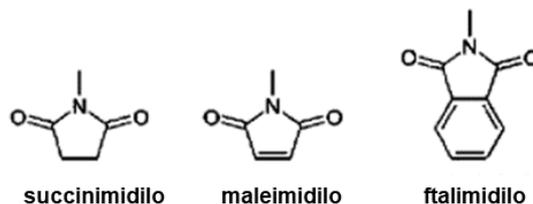
55 Acetal: -CH(OR¹)(OR²), en la que R¹ y R² son independientemente sustituyentes de acetal, por ejemplo, un grupo alquilo, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R¹ y R², tomados junto con los dos átomos de oxígeno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

60 Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), en la que R¹ es un sustituyente de hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero sin limitación, -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).

65 Cetal: -CR(OR¹)(OR²), donde R¹ y R² son como se han definido para los acetales y R es un sustituyente de cetal diferente al hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos grupos cetal incluyen, pero sin limitación, -C(Me)(OMe)₂, -C(Me)(OEt)₂, -C(Me)(OMe)(OEt), -C(Et)(OMe)₂, -C(Et)(OEt)₂, y -C(Et)(OMe)(OEt).

- Hemicetal: $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, donde R^1 es como se ha definido para los hemicetales, y R es un sustituyente de hemicetal diferente al hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$, y $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$.
- 5 Oxo (ceto, -ona): $=\text{O}$.
- Tiona (tiocetona): $=\text{S}$.
- 10 Imino (imina): $=\text{NR}$, donde R es un sustituyente de imino, por ejemplo, hidrógeno, grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $=\text{NH}$, $=\text{NMe}$, $=\text{NEt}$, y $=\text{NPh}$.
- Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$,
- 15 Acilo (ceto): $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, en la que R es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como alquilacilo C_{1-7} o alcanilo C_{1-7}), un grupo heterociclilo a C_{3-20} (también denominado como grupo heterocicilacilo C_{3-20}), o un grupo arilo C_{5-20} (también denominado como grupo arilacilo C_{5-20}), preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos acilo incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ (propionilo), $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (t-butirilo), y $-\text{C}(=\text{O})\text{Ph}$ (benzoilo, fenona).
- 20 Carboxi (ácido carboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$,
- Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): $-\text{C}(=\text{S})\text{SH}$.
- 25 Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): $-\text{C}(=\text{O})\text{SH}$.
- Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): $-\text{C}(=\text{S})\text{OH}$.
- 30 Ácido imídico: $-\text{C}(=\text{NH})\text{OH}$.
- Ácido hidroxámico: $-\text{C}(=\text{NOH})\text{OH}$.
- 35 Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$, en la que R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, y $-\text{C}(=\text{O})\text{OPh}$.
- 40 Aciloxi (éster inverso): $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$, en la que R es un sustituyente aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos aciloxi incluyen, pero sin limitación, $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$ (acetoxi), $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$, y $-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{Ph}$.
- 45 Oxicarbonilo: $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}$, en la que R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos éster incluyen, pero sin limitación, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, y $-\text{OC}(=\text{O})\text{OPh}$.
- 50 Amino: $-\text{NR}^1\text{R}^2$, en la que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como grupo alquilamino C_{1-7} o dialquilamino- C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R^1 y R^2 , tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los grupos amino pueden ser primarios ($-\text{NH}_2$), secundarios ($-\text{NHR}^1$), o terciarios ($-\text{NHR}^1\text{R}^2$) y, en su forma catiónica, pueden ser cuaternarios ($-\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3$). Ejemplos de grupos amino incluyen, pero sin limitación, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, y $-\text{NPh}$. Ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero sin limitación, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidina, piperazino, morfolino, y tiomorfolino.
- 55 Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonil carboxamida): $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, en la que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos amido incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, y $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, así como grupos amido en los cuales R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman una estructura heterocíclica tal como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo, tiomorfolinocarbonilo, y piperazinocarbonilo.
- 60 Tioamido (tiocarbamilo): $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}^1\text{R}^2$, en la que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos amido incluyen, pero sin limitación, $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, y $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$.
- 65

Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, en la que R^1 es un sustituyente de amida, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo, o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} , y R^2 es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos acilamida incluyen, pero sin limitación, $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$, y $-NHC(=O)Ph$. R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente una estructura cíclica, como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo, y ftalimidilo:

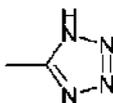


- 10 Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, en la que R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, pero sin limitación, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$, y $-OC(=O)NEt_2$.

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

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

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



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

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

Nitro: $-NO_2$.

- 35 Nitroso: $-NO$.

Azido: $-N_3$.

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

Isociano: $-NC$.

Cianato: $-OCN$.

- 45 Isocianato: $-NCO$.

Tiociano (tiocianato): $-SCN$.

- 50 Isotiociano (isotiocianato): $-NCS$.

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

- 55 Tioéter (sulfuro): $-SR$, en la que R es un sustituyente tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo (también denominado como grupo alquiltio C_{1-7}), un grupo heterociclilo, o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo alquilo. Ejemplos

de grupos alquiltio C₁₋₇ incluyen, pero sin limitación, -SCH₃ y -SCH₂CH₃.

Disulfuro: -SS-R, en la que R es un sustituyente disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado en el presente documento como disulfuro de alquilo C₁₋₇). Ejemplos de grupos disulfuro de alquilo C₁₋₇ incluyen, pero sin limitación, -SSCH₃ y -SSCH₂CH₃.

Sulfina (sulfinilo, sulfóxido): -S(=O)R, en la que R es un sustituyente sulfino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfina incluyen, pero sin limitación, -S(=O)CH₃ y -S(=O)CH₂CH₃.

Sulfona (sulfonilo): -S(=O)₂R, en la que R es un sustituyente sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇, incluidos, por ejemplo, un grupos alquilo C₁₋₇ fluorado o perfluorado. Ejemplos de grupos sulfona incluyen, pero sin limitación, -S(=O)₂CH₃ (metanosulfonilo, mesilo), -S(=O)₂CF₃ (trifilo), -S(=O)₂CH₂CH₃ (esilo), -S(=O)₂C₄F₉ (nonaflilo), -S(=O)₂CH₂CF₃ (tresilo), -S(=O)₂CH₂CH₂NH₂ (taurilo), -S(=O)₂Ph (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonil (tosilo), 4-clorofenilsulfonil (closilo), 4-bromofenilsulfonil (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalenosulfonato (napsilo), y 5-dimetilamino-naftalen-1-ilsulfonato (dansilo).

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

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

Sulfinato (éster de ácido sulfínico): -S(=O)OR; en la que R es un sustituyente sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfinato incluyen, pero sin limitación, -S(=O)OCH₃ (metoxisulfinilo; metil sulfinato) y -S(=O)OCH₂CH₃ (etoxisulfinilo; sulfinato de etilo).

Sulfonato (éster de ácido sulfóico): -S(=O)₂OR, en la que R es un sustituyente sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfonato incluyen, pero sin limitación, -S(=O)₂OCH₃ (metoxisulfonilo; metil sulfonato) y -S(=O)₂OCH₂CH₃ (etoxisulfonilo; sulfonato de etilo).

Sulfiniloxi: -OS(=O)R, en la que R es un sustituyente sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen, pero sin limitación, -OS(=O)CH₃ y -OS(=O)CH₂CH₃.

Sulfoniloxi: -OS(=O)₂R, en la que R es un sustituyente sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen, pero sin limitación, -OS(=O)₂CH₃ (mesilato) y -OS(=O)₂CH₂CH₃ (esilato).

Sulfato: -OS(=O)₂OR; en la que R es un sustituyente sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo. Ejemplos de grupos sulfato incluyen, pero sin limitación, -OS(=O)₂OCH₃ y -SO(=O)₂OCH₂CH₃.

Sulfamilo (sulfamoilo; amida de ácido sulfínico; sulfinamida): -S(=O)NR¹R², en la que R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos sulfamilo incluyen, pero sin limitación, -S(=O)NH₂, -S(=O)NH(CH₃), -S(=O)N(CH₃)₂, -S(=O)NH(CH₂CH₃), -S(=O)N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)NHPh.

Sulfonamido (sulfinamoilo; amida de ácido sulfónico; sulfonamida): -S(=O)₂NR¹R², en la que R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, pero sin limitación, -S(=O)₂NH₂, -S(=O)₂NH(CH₃), -S(=O)₂N(CH₃)₂, -S(=O)₂NH(CH₂CH₃), -S(=O)₂N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)₂NHPh.

Sulfamino: -NR¹S(=O)₂OH, en la que R¹ es un sustituyente de amino, tal como se ha definido para los grupos amino. Ejemplos de grupos sulfamino incluyen, pero sin limitación, -NHS(=O)₂OH y -N(CH₃)S(=O)₂OH.

Sulfonamino: -NR¹S(=O)₂R, en la que R¹ es un sustituyente de amino, como se ha definido para los grupos amino, y R es un sustituyente de sulfonamido, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfonamino incluyen, pero sin limitación, -NHS(=O)₂CH₃ y -N(CH₃)S(=O)₂C₆H₅.

Sulfinamino: -NR¹S(=O)R, en la que R¹ es un sustituyente de amino, como se ha definido para los grupos amino, y R es un sustituyente de sulfinamino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Ejemplos de grupos sulfinamino incluyen, pero sin limitación, -

NHS(=O)CH₃ y -N(CH₃)S(=O)C₆H₅.

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

Fosfo: -P(=O)₂.

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

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

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

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

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

Ácido fosforoso: -OP(OH)₂.

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

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

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

Conjugados

- 45 La presente invención proporciona conjugados que comprenden un dímero de PBD conectado a una unidad de ligando a través de una unidad de enlazador. La unidad de enlazador está unida por un extremo a la unidad de ligando (L) y por el otro extremo al compuesto PBD dimérico (D).

Preferencias

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

- 55 En una realización, el conjugado tiene la fórmula:



- 60 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que L, A¹, L¹, D, y p son como se han descrito anteriormente.

Cuando la unidad de especificidad L¹ es escindible, la estructura y/o secuencia de L¹ se selecciona de tal manera que se escinda mediante la acción de las enzimas presentes en el sitio diana (p. ej., la célula diana).

- 65 L¹ puede comprender un aminoácido o una secuencia contigua de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos puede ser el sustrato diana de una enzima.

L¹ es escindible mediante la acción de una enzima.

La enzima puede ser una esterasa o una peptidasa. Por ejemplo, L¹ se puede escindir mediante una proteasa lisosómica, tal como una catepsina.

5 En una realización, L¹ comprende un dipéptido. Los aminoácidos del 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.

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

15 -Phe-Lys-,
-Val-Ala-,
-Val-Lis-,
-Ala-Lys-,
-Val-Cit-,
-Phe-Cit-
20 -Leu-Cit-,
-Ile-Cit-,
-Phe-Arg-, y
-Trp-Cit-;

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

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

30 -Phe-Lys-,
-Val-Ala-,
-Val-Lis-,
-Ala-Lys-, y
-Val-Cit-.

Lo más preferentemente, el grupo -X₁-X₂- del dipéptido, -NH-X₁-X₂-CO-, es -Phe-Lys-, Val-Cit o -Val-Ala-.

35 Otras combinaciones de dipéptidos de interés incluyen:

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

Se pueden usar otras combinaciones de dipéptidos, incluidas las descritas por Dubowchik et al.

45 En una realización, la cadena lateral del 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.

50 Los grupos protectores de 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:

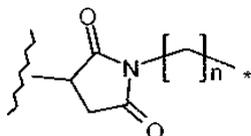
55 Arg: Z, Mtr, Tos;
Asn: Trt, Xan;
Asp: Bzl, t-Bu;
60 Cis: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
Glu: Bzl, t-Bu;
Gln: Trt, Xan;
His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
Lis: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z;
70 Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
Tre: Bz;
80 Trp: Boc;

Tir: Bzl, Z, Z-Br.

En una realización, $-X_2-$ está unido directamente a la unidad de fármaco.

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

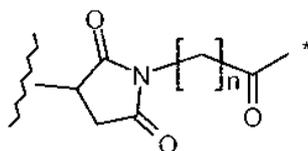
En una realización, el grupo A^1 es:



10

donde 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.

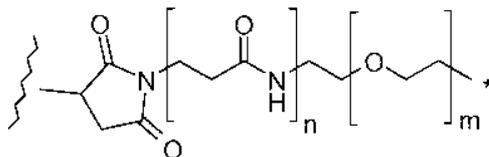
- 15 En una realización, el grupo A^1 es:



20

donde 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.

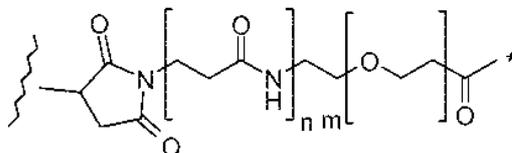
En una realización, el grupo A^1 es:



25

donde 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 preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

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



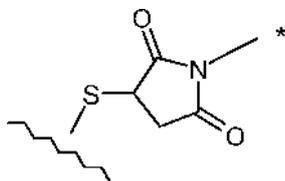
35

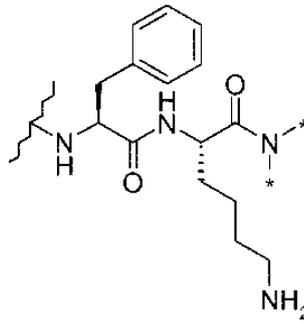
donde el asterisco indica el punto de unión a L^1 , la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

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

40

En una realización, la conexión entre la unidad de ligando y A^1 es:

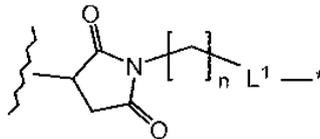




en la que los asteriscos, -N< y la línea ondulada son como se han definido anteriormente.

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

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



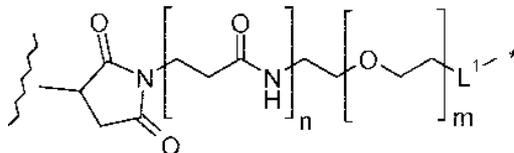
10 en los que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



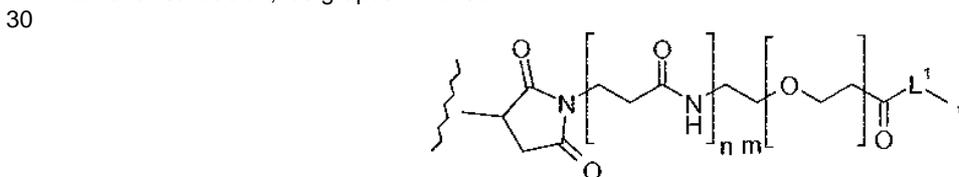
20 en los que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6. En una realización, n es 5.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



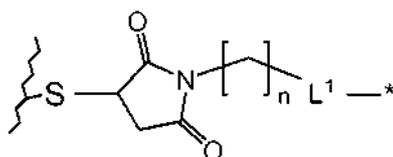
25 en los que el asterisco indica el punto de unión a D, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

En una realización, los grupos A¹-L¹ son:



35 en los que 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 preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 7, preferentemente 3 a 7, lo más preferente 3 u 7.

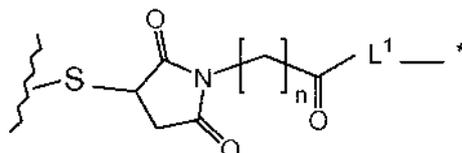
En una realización, los grupos L-A¹-L¹ son:



en los que 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.

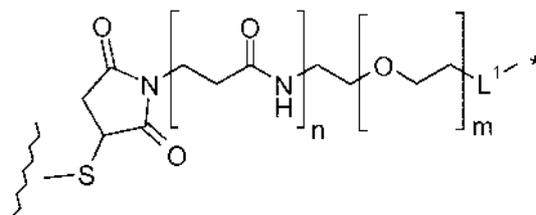
5

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



10 en los que 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-A¹-L¹ son:

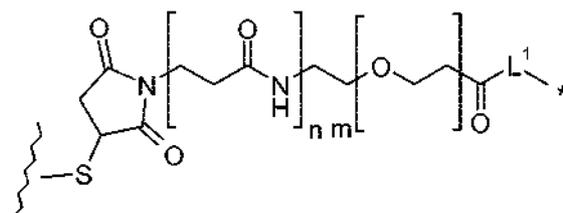


15

en los que 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 preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 8, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

20

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



25 en los que 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 preferida, n es 1 y m es 0 a 10, 1 a 7, preferentemente 4 a 8, lo más preferente 4 u 8.

Enlazador-fármacos

30

En otras realizaciones, los compuestos de enlazador-fármaco se proporcionan para su 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.

35

En una realización, donde L¹ 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 eliminan 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.

40

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 et al.

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 preferido.

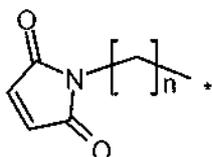
- 5 El grupo funcional G^1 forma un grupo de conexión tras la reacción con una unidad de ligando (por ejemplo, un agente de unión a la célula).

G^1 comprende un grupo maleimida.

- 10 En una realización, el grupo G^1 es un grupo alquilmaleimida. Este grupo es adecuado para su reacción con grupos tiol, particularmente grupos tiol de cisteína, presente en el agente de unión a la célula, por ejemplo presente en un anticuerpo.

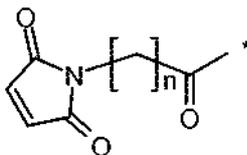
En una realización, el grupo G^1 es:

15



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.

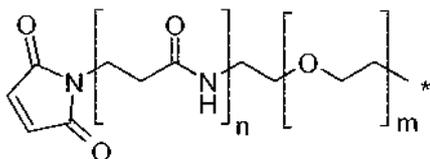
- 20 En una realización, el grupo G^1 es:



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.

25

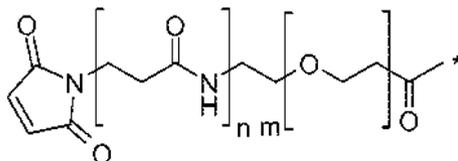
En una realización, el grupo G^1 es:



- 30 donde el asterisco indica el punto de unión a L^1 , n es 0 o 1 y m es 0 a 30. En una realización preferida, 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 G^1 es:

35



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

- 40 *Unidad de ligando*

La unidad de ligando se une específicamente a una molécula diana y puede ser un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo.

- 45 La unidad de ligando también se denomina en el presente documento "agente de unión" o "agente de

direccionamiento".

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 (por ejemplo, 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 (por ejemplo, ASB, caseína) distinta de la molécula predeterminada o una molécula estrechamente relacionada.

Ejemplos de unidades de ligando incluyen los agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

En algunas realizaciones, la unidad de ligando es un agente de unión a célula que se une a una diana extracelular de una célula.

El agente de unión a célula también es 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).

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.

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

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen los anticuerpos descritos en el documento WO 2005/082023.

Son especialmente preferidos los anticuerpos contra antígenos asociados a tumores. Ejemplos de esos antígenos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación, dichos antígenos asociados a tumores definidos en el documento WO 2005/082023. Véanse, por ejemplo, las páginas 41-55.

En algunas realizaciones, los conjugados están diseñados para dirigirse a células tumorales a través de los antígenos de su superficie celular. Los antígenos pueden ser antígenos de superficie celular que están expresados en exceso, o que se expresan en momentos o tipos celulares anómalos. 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.

Se han sensibilizado anticuerpos para dirigirse a antígenos específicos relacionados con tumores, que incluyen: Cripto, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, a la glicoproteína NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD70, CD79, CD138, al PSCA, al PSMA (antígeno prostático específico de membrana), al BCMA, a la E-selectina, EphB2, a la 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, 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 conectada a A de la unidad de enlazador.

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.

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.

Los restos de cisteína de la unidad de ligando pueden estar disponibles para su 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, por ejemplo, mediante el tratamiento del anticuerpo con DTT antes de la reacción con el grupo funcional de la unidad del enlazador.

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.

Métodos de tratamiento

Los compuestos y 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 o conjugado divulgado en el presente documento. 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 ciclo de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, es de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos.

Un compuesto o conjugado se puede administrar solo o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero sin limitación, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluidos, por ejemplo, fármacos); cirugía; y radioterapia.

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 o conjugado divulgado en el presente documento, un excipiente, transportador, tampón, 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 transportador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un transportador sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un transportador 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.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que no tenga pirógenos y que tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

Los compuestos y conjugados pueden usarse para tratar una enfermedad proliferativa y una enfermedad autoinmunitaria. El término "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anómalas que no es deseada, tales como, crecimiento neoplásico o hiperplásico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero sin limitación, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluyendo, aunque sin limitación, neoplasias y tumores (por ejemplo, histocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, 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 testículos, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, pero sin limitación, hematológicos; neoplasias tales como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkin, y subtipos tales como LDCGB, zona marginal, zona del manto, y folicular, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen en linfocitos B o T.

Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen las siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), artritis psoriásica, oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmunitario, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto,

enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, 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 autoinmunitaria 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 autoinmunitaria, pulmón del cuidador de aves, necrosis 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, encefalomielititis, endocarditis, fibrosis endomiocárdial, endoftalmitis, 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, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome de Evan, e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de los linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto frente a hospedador) o linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, o enfermedad crónica de injerto frente a hospedador). En general, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th1 o linfocitos Th2. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno inmunológico mediado por linfocitos 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 5 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 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.

Incluye otras formas

Salvo que se especifique otra cosa, se incluyen en lo anterior las formas iónicas, sal, 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 un 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 clorhidrato, 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, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), a continuación, la sal se puede formar 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, ion amonio (es decir NH₄⁺) e iones de amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Ejemplos de algunos iones amonio sustituido adecuados son los procedentes de: etilamina, dietilamina, diciclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, $-NH_2$ puede ser $-NH_3^+$), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

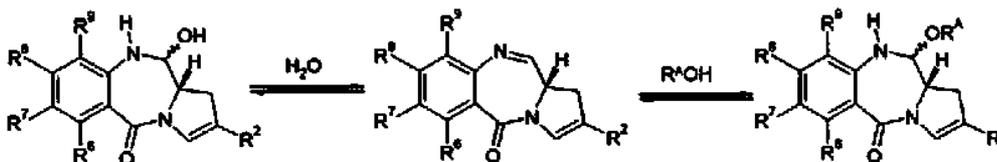
5 Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalenocarboxílico, 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 obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

15 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 (por ejemplo, principio activo, sal de principio activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede definir convenientemente como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

Carbinolaminas

25 La invención incluye compuestos en los que un disolvente se añade a través del enlace imina del resto PBD, que se ilustra a continuación donde el disolvente es agua o un alcohol ($R^A OH$, donde R^A es alquilo C_{1-4}):



30 Estas formas se pueden llamar denominar formas de carbinolamina y éter de carbinolamina de 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.

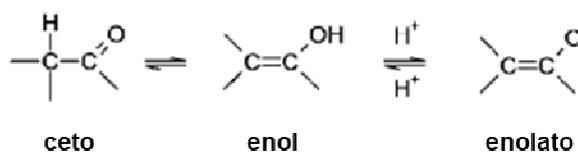
Estos compuestos especiales se pueden aislar en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

35 Isómeros

Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas especiales, incluyendo, aunque sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; 40 formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de bote, silla, torsionadas, de sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, colectivamente denominadas en lo sucesivo "isómeros" (o "formas isoméricas").

45 Cabe destacar que, salvo en los descrito a continuación para formas tautómeras, específicamente excluidas del término "isómeros", 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, $-OCH_3$, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-CH_2OH$. De manera similar, una referencia al ortoclorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una 50 clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas comprendidas en dicha clase (por ejemplo, alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

55 La exclusión anterior no concierne a las 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/iminoalcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiolo, N-nitroso/hidroxiatio y nitro/aci-nitro.



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

Salvo que se especifique otra cosa, una referencia a un compuesto particular incluye todas las formas isoméricas, incluyendo (total o parcialmente) formas racémicas y otras mezclas de las mismas. Los métodos de preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, 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.

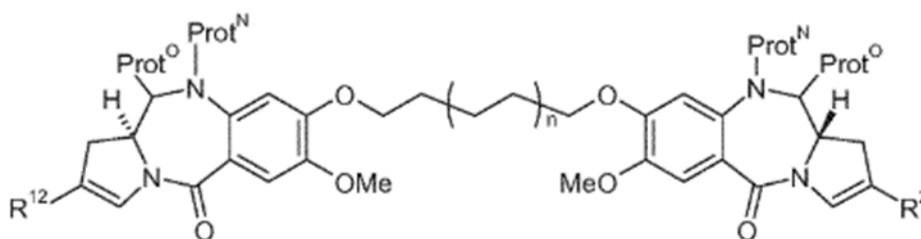
Rutas de síntesis generales

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

- 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).

Ruta de síntesis

Los compuestos de la presente invención, en los que R^{10} y R^{11} 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

donde n es 0 o 1, y R^2 y R^{12} representan los grupos aromáticos C2 de los compuestos de la presente invención, como se muestra en la tabla siguiente:

	R^2	R^{12}	n
C1			0
C2			1
C3			1

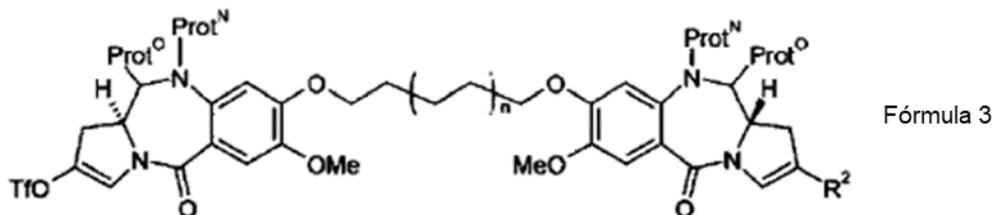
C4			1
C5			1
C6			1

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 convencionales.

- 5 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 Cd/Pb para producir el compuesto de la presente invención. 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.
- 10

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

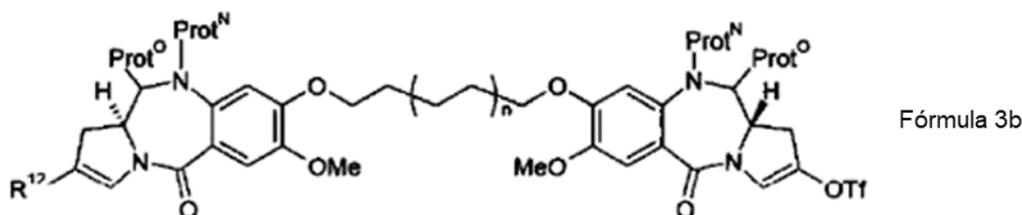
15



donde R², Prot^N y Prot^O son como se han definido para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R¹², tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o un ácido borónico.

20

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

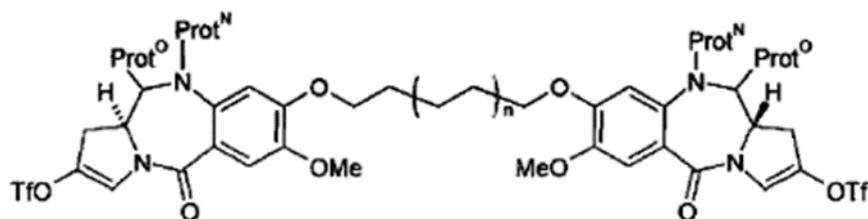


25

donde R¹², Prot^N y Prot^O son como se han definido para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de un derivado organometálico que comprende R², tal como un derivado de organoboro. El derivado de organoboro puede ser un boronato o un ácido borónico.

30

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



Fórmula 4

donde Prot^N y Prot^O son como se han definido para los compuestos de fórmula 2, mediante el acoplamiento de aproximadamente un único equivalente (por ejemplo, 0,9 o 1 a 1,1 o 1,2) de un derivado organometálico, tal como un derivado de organoboro, que comprende R² o R¹².

Los acoplamientos descritos anteriormente se llevan a cabo normalmente en presencia de un catalizador de paladio, por ejemplo Pd(PPh₃)₄, Pd(OCOCH₃)₂, PdCl₂, Pd₂(dba)₃. El acoplamiento se puede llevar a cabo en condiciones convencionales, o también se puede llevar a cabo en condiciones de microondas.

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 recipiente 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 los que Prot^O es un grupo oxo y Prot^N es SEM se describen en detalle en el documento WO 00/12508.

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

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.

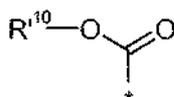
Los compuestos de la presente invención donde R¹⁰ es H y R¹¹ es SO₂M, se pueden sintetizar a partir de los compuestos de la presente invención donde R¹⁰ y R¹¹ forman un enlace doble nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los están unidos, mediante la adición de la sal de bisulfito o sulfinato adecuada, seguida por una etapa de purificación necesaria. En el documento GB 2 053 894 se describen otros métodos.

En algunas realizaciones de la invención, puede resultar que los compuestos de Fórmula 2 se usen en la síntesis de los compuestos enlazadores de fármaco. En estas realizaciones, la eliminación de los grupos protectores N10/C11 se puede realizar durante la síntesis de los compuestos enlazadores de fármaco.

Grupos protectores de nitrógeno para síntesis

Los grupos protectores de nitrógeno para síntesis son bien conocidos en la técnica. En la presente invención, los grupos protectores de especial interés son los grupos carbamato como protectores de nitrógeno y los grupos protectores hemiaminales para el nitrógeno.

Los grupos carbamato como protectores de nitrógeno tienen la siguiente estructura:



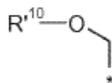
en la que R¹⁰ es R como se ha definido anteriormente. Un importante número de grupos adecuados se describe en las páginas 503 a 549 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Los grupos protectores especialmente preferidos incluyen Troc, Teoc, Fmoc, BOC, Doc, Hoc, TcBOC, 1-Adoc y 2-Adoc.

Otros posibles grupos son nitrobenziloxicarbonilo (por ejemplo, 4-nitrobenziloxicarbonilo) y 2-(fenilsulfonyl)etoxicarbonilo.

Estos grupos protectores que se pueden eliminar mediante catálisis de paladio no son preferidos, por ejemplo Alloc.

Los grupos hemiaminales como protectores de nitrógeno tienen la siguiente estructura:



- 5 en la que R¹⁰ es R como se ha definido anteriormente. Un importante número de grupos protectores adecuados se describe en las páginas 633 a 647 como grupos protectores de amida en Greene, T.W. y Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc.
- Los grupos divulgados en el presente documento se pueden aplicar a los compuestos de la presente invención. Dichos grupos incluyen, pero sin limitación, SEM, MOM, MTM, MEM, BOM, BOM sustituido con nitro o metoxi, Cl₃CCH₂OCH₂-.

Grupo de oxígeno protegido para síntesis

- 15 Los grupos de oxígeno protegido para síntesis son bien conocidos en la técnica. Un importante número de grupos protectores de oxígeno adecuados se describe en las páginas 23 a 200 de Greene, T.W. y Wuts, G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Las clases de especial interés incluyen éteres de sililo, éteres de metilo, éteres de alquilo, éteres de bencilo, ésteres, acetatos, benzoatos, carbonatos, y sulfonatos.

- 20 Los grupos protectores de oxígeno preferidos incluyen acetatos, TBS y THP.

Síntesis de conjugados de fármacos

- 25 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, Patente de EE.UU. n.º 7.498.298 así como en el documento WO 2009/0117531.

- 30 Se pueden preparar otros enlazadores de acuerdo con las referencias citadas en el presente documento o conocidas de 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 las Patentes de EE.UU. números 6.214.345 y 7.498.298; y el documento WO 2009-0117531, o como conocen de otra manera los expertos en la técnica.

- 40 Los anticuerpos pueden conjugarse con compuestos de enlazador-fármaco como se describe en Doronina et al., *Nature Biotechnology*, 2003, 21, 778-784). En resumen, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS que contiene borato de sodio 50 mM a pH 7,4 se reducen con clorhidrato 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.

- 50 Los anticuerpos con restos de cisteína introducidos pueden conjugarse con compuestos de enlace-fármaco como se describe en la publicación de Patente Internacional WO2008/070593.

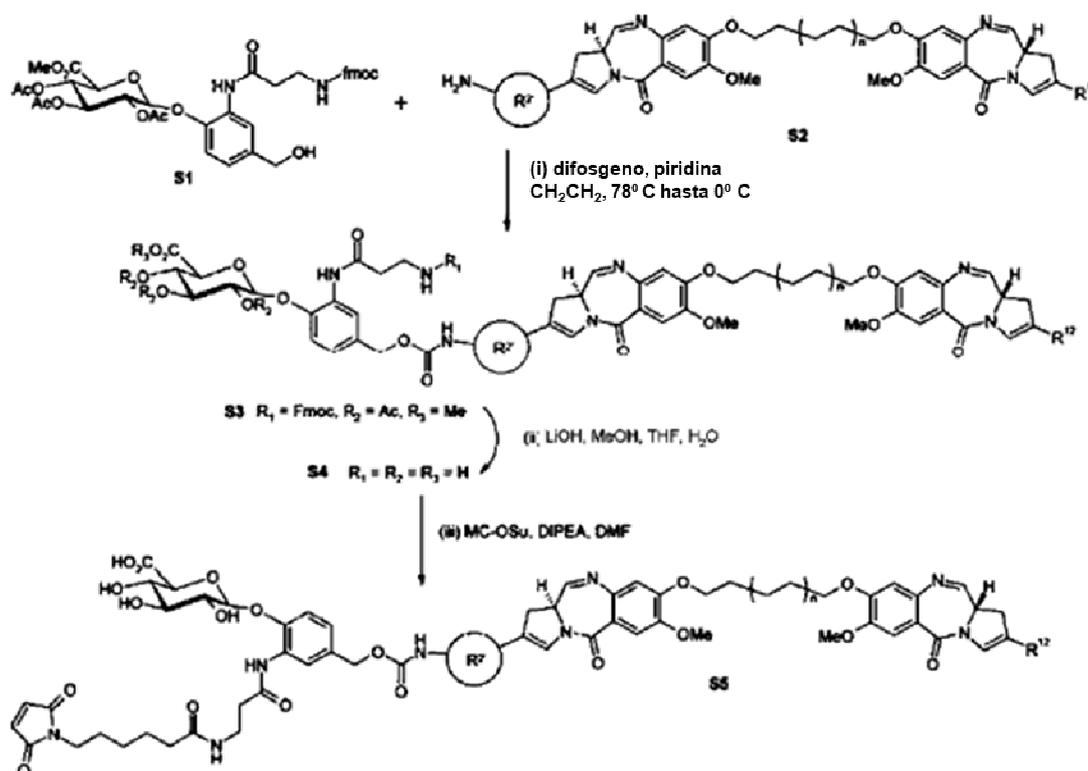
- Los anticuerpos que contienen un resto de cisteína introducido en la cadena pesada se reducen completamente añadiendo 10 equivalentes de TCEP y EDTA 1 mM y ajustando el pH a 7,4 con tampón Tris 1 M (pH 9,0). Después de una incubación de 1 hora a 37 °C, la reacción se enfría a 22 °C y se añaden 30 equivalentes 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 % (por ejemplo, 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 la

- mezcla, 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. (Se debe tener 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).

Esquemas ilustrativos para la síntesis de enlazadores de fármaco

- 10 El siguiente esquema es ilustrativo de las rutas para sintetizar enlazadores de fármaco.

Esquema A



- 15 R² representa la parte de R² (como se ha definido anteriormente) que une el núcleo de PBD con el grupo NH₂ (para el compuesto C1, el grupo NH₂ está sustituido por NHMe). n es como se ha definido anteriormente.

- El enlazador de glucurónido intermedio S1 (referencia: Jeffrey *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 2006, 17, 831-840) se puede tratar con difosgeno en diclorometano a -78 °C para proporcionar el clorofornato de glucurónico, que a continuación se hace reaccionar con el PBD dimérico S2 disuelto en CH₂Cl₂ mediante adición gota a gota. El calentamiento de la reacción a 0° C durante 2 horas seguido de extracción proporcionará el compuesto S3. El tratamiento de una solución de S3 en una mezcla de igual cantidad de disolventes MeOH, tetrahydrofurano, y agua (enfriada a 0 °C) con hidróxido de litio monohidrato durante 4 horas, seguido de reacción con ácido acético glacial proporcionará el compuesto S4. La adición de éster de maleidocaproil NHS a una solución de S4 en DMF, seguido de diisopropiltilamina y agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas proporcionará el enlazador de fármaco deseado S5.

Los métodos de los Ejemplos 2, 3, 4, 6, 7 y 8 se podrían adaptar a todos los compuestos de PBD de la presente invención.

Otras preferencias

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

Cuando R¹⁰ es un grupo carbamato protector de nitrógeno, puede ser preferentemente Teoc, Fmoc y Troc y, más

preferentemente, puede ser Troc.

Cuando R¹¹ es O-Prot^O, en la que Prot^O es un grupo protector de oxígeno, Prot^O puede ser preferentemente TBS o THP, y más preferentemente puede ser TBS.

5 Cuando R¹⁰ es un grupo hemiaminal protector de nitrógeno, puede ser preferentemente MOM, BOM o SEM y, más preferentemente, puede ser SEM.

Conjugados

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



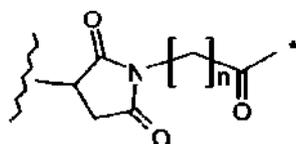
15 en la que el asterisco indica el punto de unión al dímero (D) de PBD, ABC es el agente de unión a la célula, L¹ es una unidad de especificidad que se puede escindir mediante la acción de una enzima y A¹ es una unidad de extensión que conecta L¹ al agente de unión a la célula.

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



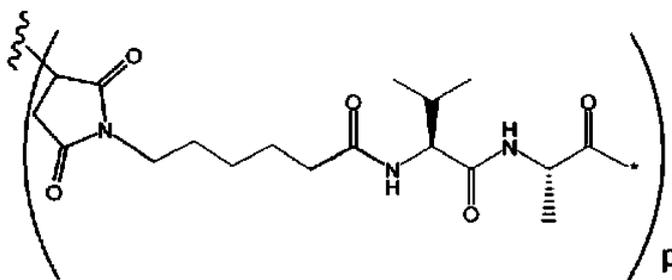
25 en la que el asterisco indica el punto de unión al dímero (D) de PBD, ABC es el agente de unión a la célula, A¹ es una unidad de extensión que conecta L¹ al agente de unión a la célula y L¹ es una unidad de especificidad que se puede escindir mediante la acción de la catepsina, L¹ es un dipéptido,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

30 Los conjugados preferidos de la presente invención incluyen cualquiera de los descritos en los puntos (a) y (b) en los que A¹ es



35 donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a ABC, y n es 0 a 6 (preferentemente n es 5).

Los conjugados preferidos de la presente invención incluyen aquellos en los que la unidad de ligando es



40 en la que la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando (por ejemplo, anticuerpo) y el asterisco indica el punto de unión a D.

45 En una realización particularmente preferida, para todos los conjugados, 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.

50 En una realización particularmente preferida, para todos los conjugados preferidos, 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, EphB2, a la melanotransferina, al antígeno Muc16 o al antígeno TMEFF2.

Ejemplos

5

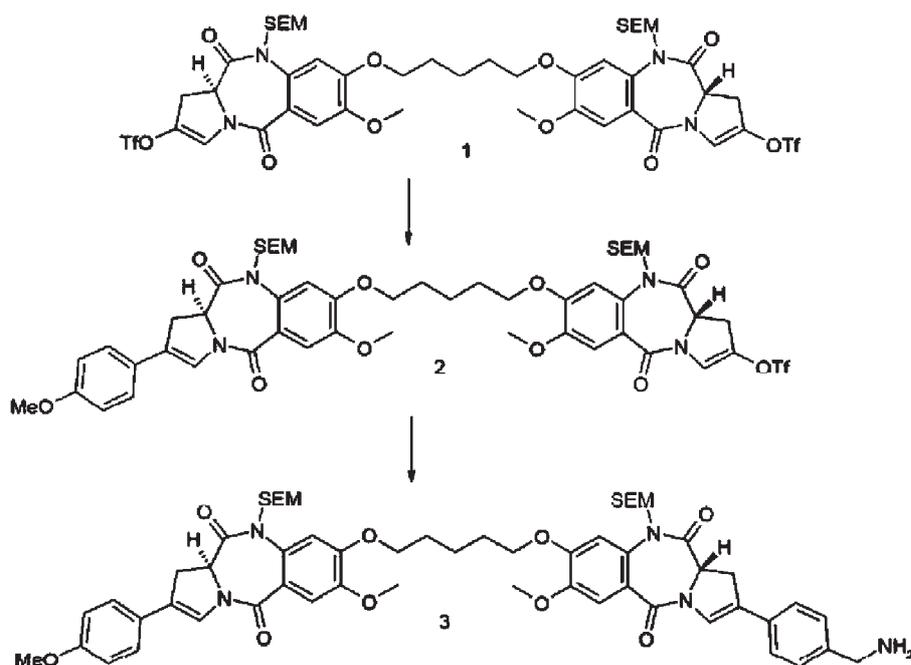
Métodos experimentales generales para el Ejemplo 1

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Belitnham 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 ^{13}C 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 ($\delta = 0,0$ 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 PDA. Los parámetros del Waters Micromass ZQ usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente ($^{\circ}\text{C}$), 100; temperatura de desolvatación ($^{\circ}\text{C}$), 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 Micromass 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, F_{254}), 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), el resto de 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 de 4 Å o alambre de sodio. El éter de petróleo se refiere a la fracción con punto de ebullición en 40-60 $^{\circ}\text{C}$.

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 durante 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 ciclo total en gradiente es de 5 min. Caudal 3,0 ml/min 400 μl se dividió con un accesorio en forma de T de volumen cero que se introduce en el 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

35

Ejemplo 1



40

(a) (S)-2-(4-metoxifenil)-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-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-5,11(10H, 11aH)-diona (2)

5 Un complejo de tetraquis-*tris*-fenilfosfina paladio (38 mg, $3,23 \times 10^{-5}$ mol, 0,02 equiv.) se añadió a una mezcla desgasificada en agitación de 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) (Compuesto 8b del documento WO 2010/043880) (185 mg, 1,62 mmol, 1,0 equiv.), ácido 4-metoxifenilborónico (234 mg, 1,54 mmol, 0,95 equiv.) y Na_2CO_3 (274 mg, 2,59 mmol, 1,6 equiv.) en tolueno/etanol/agua (10 ml/5 ml/5 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y la porción acuosa se separó. La porción orgánica se lavó con agua, solución acuosa saturada de salmuera, se secó (MgSO_4) y se evaporó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [elución en gradiente, etilacetato 30 %/*n*-hexano 70 % a etilacetato 80 %/*n*-hexano 20 %] dio como resultado el producto en forma de una espuma de color amarillo (0,7 g, 39 %). Datos analíticos: TR 3,97 min; EM (ES^+) *m/z* (intensidad relativa) 1103 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100).

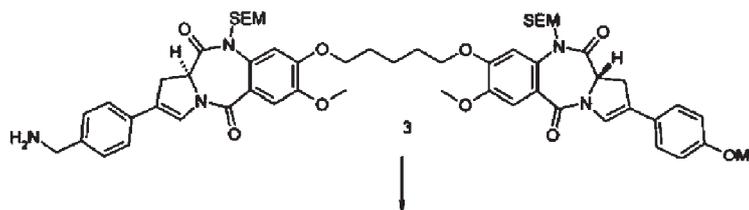
(b) (S)-2-(4(aminometil)fenil)-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrol[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrol[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H, 11aH)-diona (3)

20 Un complejo de tetraquis-*tris*-fenilfosfina paladio (30 mg, $2,5 \times 10^{-5}$ mol, 0,04 equiv.) se añadió a una mezcla desgasificada del metoxitriolato (2) (700 mg, 0,63 mmol, 1,0 equiv.), ácido 4-aminometilfenilborónico (190 mg, 1,015 mmol, 1,6 equiv.) y Na_2CO_3 (303 mg, 2,85 mmol, 4,5 equiv.) en tolueno/etanol/agua (20 ml/10 ml/10 ml). La mezcla de reacción se calentó a 75 °C en una atmósfera de argón durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y la porción acuosa se separó. La porción orgánica se lavó con agua, solución acuosa saturada de salmuera, se secó (MgSO_4) y se evaporó a presión reducida para dar el proporcionó el producto en forma de una espuma de color marrón. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [elución en gradiente, etilacetato 50 %/*n*-hexano 50 % a etilacetato 100 %] dio como resultado el producto (0,55 g, 82 %). Datos analíticos: TR 3,48 min; EM (ES^+) *m/z* (intensidad relativa) 1060 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100).

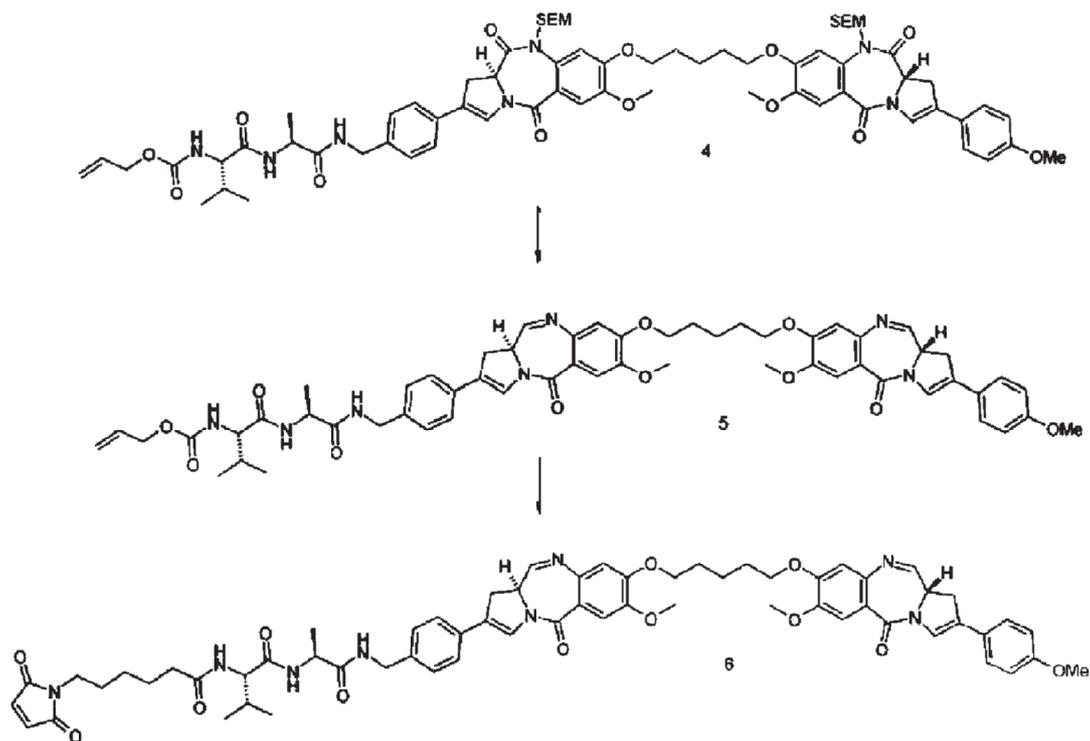
Métodos experimentales generales para el Ejemplo 2

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 consistió en acetonitrilo y agua, conteniendo ambos bien ácido trifluoroacético al 0,05 % o ácido fórmico al 0,1 % (denotado para cada compuesto). Los compuestos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo ácido desde el 5 % a 1 min después de la inyección, a 95 % a 11 min, seguido de acetonitrilo isocrática al 95 % a 15 minutos (caudal = 1,0 ml/min). La CLEM 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 acetonitrilo isocrático al 95 % 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. Los datos de los espectros de RMN se recogieron en un espectrómetro Varian Mercury 400 MHz. Las constantes de acoplamiento (J) se notifican en hertzios.

Ejemplo 2



55



5 (a) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-Metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-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)pentil)oxi)-5,11-dioxo-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)encil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo(4)

10 Un matraz de 10 ml se cargó con alloc-Val-Ala (15 mg, 57 μ mol), EEDQ (17 mg, 69 μ mol) y 0,72 ml de CH_2Cl_2 anhidro. Se añadió metanol (40 μ l) para facilitar la disolución y la mezcla se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 15 minutos. Se añadió SEM-dilactamabencilamina 3 (40 mg, 38 μ mol) a continuación y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, momento en el cual la CL-EM reveló la conversión en producto. La reacción se concentró, se disolvió en una cantidad mínima de CH_2Cl_2 , y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 90:10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para proporcionar 4 (42 mg, 85 %). CL-EM: t_R 15,50 min, m/z (ES^+) observado 1315,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

15 (b) ((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-Metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)encil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (5)

20 Un matraz de 10 ml secado a la llama se cargó con 4 (40 mg, 30 μ mol) y THF anhidro (0,6 ml) y se enfrió a -78 °C. Se añadió trietilborohidruro de litio (60 μ l de una solución 1 M en THF) gota a gota y la reacción se agitó en atmósfera de nitrógeno a -78 °C durante 2 h, momento en el cual la CL-EM reveló aproximadamente una conversión del 50 %. A continuación se añadieron 30 μ l del reductor, y la agitación se continuó durante dos horas más, momento en el que la reacción se había completado. Después la reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de agua y se calentó hasta temperatura ambiente, después se diluyó con 25 ml de salmuera y se extrajo tres veces con 25 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico, y se concentraron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en cloroformo (0,75 ml), etanol (2 ml), y agua (0,3 ml), y se añadieron 800 mg de gel de sílice, proporcionando una suspensión espesa que se cerró herméticamente y se agitó a temperatura ambiente durante cuatro días. En ese momento, el análisis por CCF reveló la conversión a la imina 5. El gel de sílice se filtró a continuación y se lavó varias veces con metanol al 10 % en cloroformo hasta que no se observó más absorbancia del PBD en el filtrado. A continuación los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico, y se concentraron a sequedad. El residuo se disolvió a continuación en la cantidad mínima de CH_2Cl_2 , y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 90:10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para proporcionar 3 (19 mg, 61 %). HPLC analítica: t_R 11,99 min. CL-EM: t_R 12,76 min, m/z (ES^+) observado 1022,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

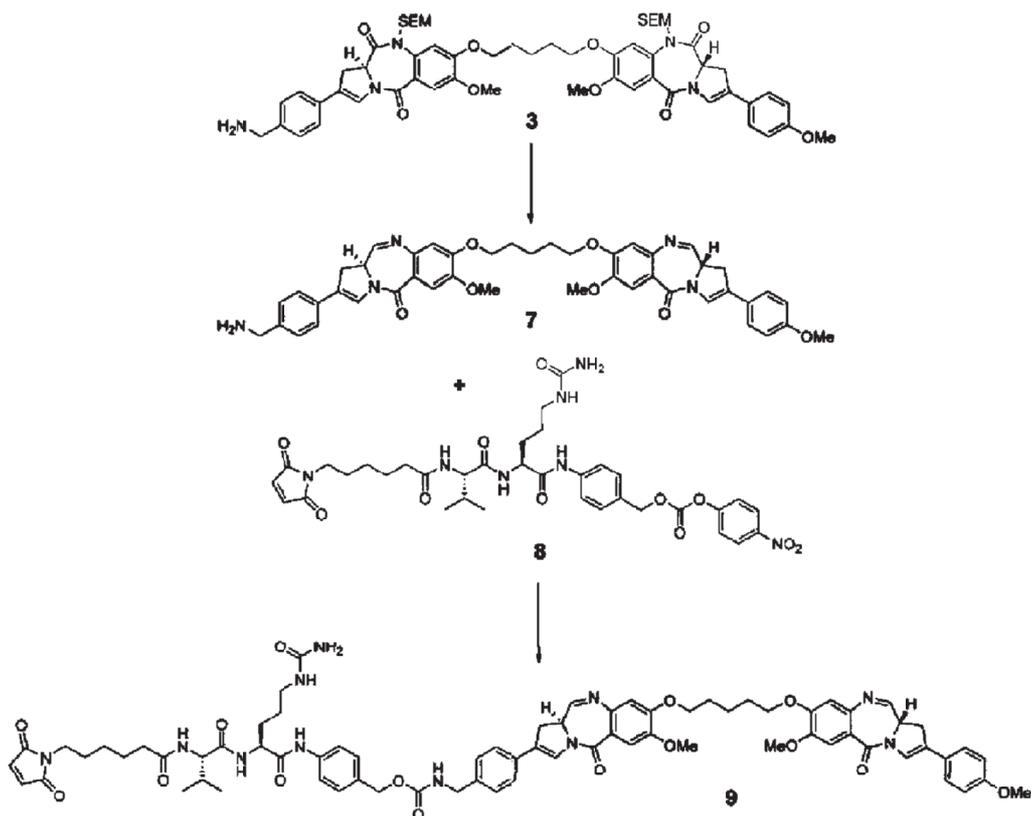
35 (c) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-(((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)encil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida (6)

40

La diimina de PMD 5 protegida con Alloc (19 mg, 19 μ mol) se añadió a un matraz secado con llama y se disolvió en diclorometano anhidro (1,9 ml). Se añadieron trifenilfosfina (0,25 mg, 1 μ mol), pirrolidina (3,1 μ l, 38 μ l), y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,5 mg, 0,5 μ mol) se añadieron, la reacción se agitó a continuación en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual la CL-EM reveló la desprotección completa de alloc. La reacción se cargó directamente sobre una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 80:20 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para proporcionar la amina libre (14 mg, 79 %). HPLC analítica: t_R 9,32 min. CL-EM: t_R 11,61 min, m/z (ES^+) observado 938,5 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. La amina libre se disolvió a continuación en DMF anhidra (0,37 ml) y se añadió éster de maleimidocaproil NHS (6,9 mg, 22 μ mol), seguido de diisopropiletilamina (13 μ l, 75 μ l). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante tres horas, momento en el cual la CL-EM reveló el consumo completo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 90:10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para proporcionar 4 (15 mg, 89 %). HPLC analítica: t_R 11,63 min. CLEM: t_R 12,73 min, m/z (ES^+) observado 1132,1 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Métodos experimentales generales para los Ejemplos 3-7. 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 μ m, 80 Å de fase inversa. La fase móvil ácida consistió en acetonitrilo y agua, conteniendo ambos bien ácido trifluoroacético al 0,05 % o ácido fórmico al 0,1 % (denotado para cada compuesto). Los compuestos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo ácido desde el 5 % a 1 min después de la inyección, a 95 % a 11 min, seguido de acetonitrilo isocrático al 95 % a 15 minutos (caudal = 1,0 ml/min). La CLEM 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 μ m, 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 acetonitrilo isocrático al 95 % 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 μ m, 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. Los datos de los espectros de RMN se recogieron en un espectrómetro Varian Mercury 400 MHz. Las constantes de acoplamiento (J) se notifican en hertzios.

Ejemplo 3



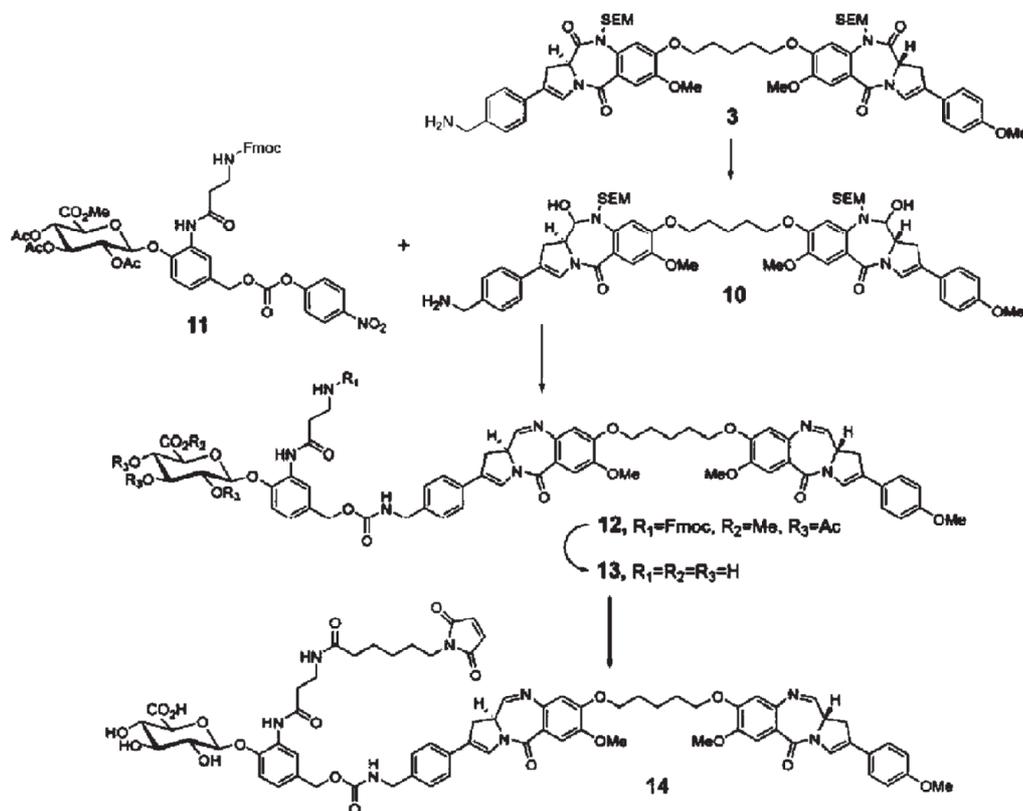
(a) (S)-2-(4-(aminometil)fenil)-7-metoxi-8-(((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (7)

Un matraz secado a la llama se cargó con dilactama SEM 3 (100 mg, 94 μ mol, 1 eq) disuelta en tetrahidrofurano anhidro (THF, 1,9 ml), y se enfrió a -78 $^{\circ}$ C. Se añadió gota a gota trietilborohidruro de litio (0,19 ml de una solución 1 M en THF, 188 μ mol, 2 equiv.) se añadió gota a gota y la reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora, momento en el cual la CL reveló una conversión incompleta en producto. Se añadieron 0,1 ml más del reductor y la reacción se agitó durante una hora más. La reacción se interrumpió por adición de agua (3 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 secaron con sulfato de sodio, y se evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió en una mezcla de diclorometano (2,4 ml), etanol (6,2 ml), y agua (0,9 ml), y se añadió gel de sílice (2,4 g). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El análisis por CCF reveló la conversión a la imina 7, 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 70 mg del dímero de imina 7 en bruto, que se dividió, y 40 mg se tomaron para su purificación. El material se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100:0 a 80:20) para proporcionar 7 (11 mg, 27 % para el material dividido). CCF: $R_f = 0,21$, MeOH al 20 % en CH_2Cl_2 . CL-EM: t_R 11,30 min, m/z (ES^+) observado 768,3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(b) 4-(((S)-7-metoxi-8-(((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)encilcarbamato de 4-(((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo (9)

Un matraz secado a la llama se cargó con bencilamina 7 (7,3 mg, 9,5 μ mol, 1 equiv.) disuelta en dimetilformamida anhidra (0,2 ml). Se añadió maleimidocaproil-Valina-Citrulina-PAB-OCO-pNP (Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13, 855-869) (7 mg, 9,5 μ mol, 1 equiv.), seguido de diisopropiletamina (16,5 μ l, 95 μ mol, 10 equiv.), la reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La CL reveló la conversión del producto después de 1,5 horas; la reacción se diluyó con diclorometano y se cargó directamente sobre una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ mixtures (100:0 a 80:20) para proporcionar en enlazador de fármaco 9 purificado (9,3 mg, 72 %). CCF: $R_f = 0,24$, MeOH al 10 % en CH_2Cl_2 . CLEM: t_R 12,61 min, m/z (ES^+) observado 1366,8 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Ejemplo 4



(a) Triacetato de (2S,3R,4S,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-(((S)-7-

metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)bencil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-metiltetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (12)

5 Un matraz secado a la llama se cargó con dilactama SEM 3 (40 mg, 38 μ mol, 1 eq) disuelta en tetrahidrofurano anhidro (0,8 ml), y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota trietilborohidruro de litio (80 μ l de una solución 1 M en THF, 76 μ mol, 2 eq.) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas, momento en el cual la CL reveló una conversión incompleta en producto. Se añadieron 40 μ l del reductor y la reacción se agitó durante una hora más. La reacción se interrumpió por 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 secaron con sulfato de sodio, y se evaporaron a sequedad. La SEM carbinolamina **10** (39 mg) se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional. Un enlazador de glucurónico **11** activado (Jeffrey et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17, 831-840) (38 mg, 42 μ mol, 1,1 equiv.) se disolvió en dimetilformamida anhidra (0,6 ml) y se añadió a un matraz que contenía **10** (39 mg, 37 μ mol, 1 equiv.). Se añadió diisopropiletilamina (13 μ l, 74 μ mol, 2 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno; después de 1,5 horas, la CL-EM reveló la conversión al producto acoplado. La reacción 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 secaron con sulfato de sodio, y se evaporaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en una mezcla de cloroformo (0,7 ml), etanol (1,25 ml), y agua (0,17 ml), y gel de sílice (1 g) se añadió. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. El análisis por CCF reveló la conversión a la imina **12**, 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 producto **12** en bruto. El material se disolvió en una cantidad mínima de diclorometano y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluida con mezclas de CH₂Cl₂/MeOH (100:0 a 80:20) para proporcionar **12** (25 mg, 36 %). CL-EM: m/z (ES⁺) observado 1542,9 (M+H)⁺.

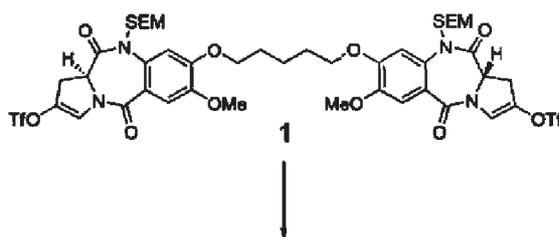
(b) ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-aminopropanamido)-4-(((4-(((S)-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)bencil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (13)

El enlazador de glucurónido protegido **12** (25 mg, 16 μ mol, 1 equiv.) se disolvió en metanol (0,5 ml) y tetrahidrofurano (0,5 ml), y se enfrió a 0 °C. Hidróxido de litio monohidrato (4 mg, 96 μ mol, 6 equiv.) se disolvió en agua (0,5 ml) y se añadió gota a gota a la reacción, que se dejó calentar hasta la temperatura ambiente después y se controló mediante CL-EM. Se añadió más cantidad de LiOH (3,2 mg, 76 μ mol, 4,8 equiv.) en 0,4 ml de agua a la reacción después de 2 h para impulsar adicionalmente la conversión al producto. Se añadió ácido acético glacial (11 μ l, 195 μ mol, 12 equiv.), seguido de 1 ml de dimetilsulfóxido, a continuación, los disolventes volátiles se eliminaron por evaporación rotatoria. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el enlazador de glucurónido desprotegido **13** (2 mg, 11 %). CL-EM: t_R 11,54 min, m/z (ES⁺) observado 1180,0 (M+H)⁺.

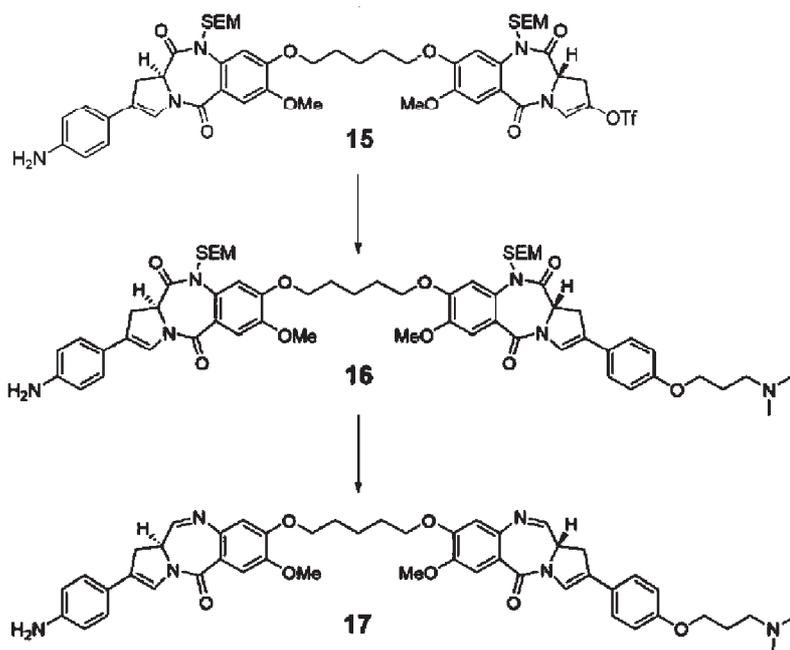
(c) ácido (2S, 3S, 4S, 5R, 6S)-6-(2-(3-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)propanamido)-4-(((4-(((S)-7-metoxi-8-((5-(((S)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-2-il)bencil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (14)

Un matraz secado a la llama se cargó con enlazador de glucurónido **13** (2 mg, 1,7 μ mol, 1 equiv.), N-hidroxisuccinimida éster del ácido maleimidocaproico (0,8 mg, 2,6 μ mol, 1,5 equiv.), y dimetilformamida anhidra (85 μ l). Se añadió diisopropiletilamina (1,5 μ l, 8,5 μ mol, 5 equiv.), la reacción se agitó a continuación a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Después de 2 horas, la HPLC reveló la conversión al producto. La reacción se diluyó en dimetilsulfóxido y se purificó por HPLC preparativa para proporcionar el enlazador de glucurónido PBD **14** (1,4 mg, 61 %). CL-EM: t_R 12,30 min, m/z (ES⁺) observado 1373,7 (M+H)⁺.

Ejemplo 5



55



(a) trifluorometanosulfonato de (S)-8-((5-(((S)-2-(4-aminofenil)-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)pentil)oxi)-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-2-ilo (15)

Un matraz se cargó con bistriflato 1 (500 mg, 437 μmol , 1 equiv.) disuelto en tolueno (6,5 ml), etanol (3,2 ml), y agua (3,2 ml). A la solución agitada se añadió éster de pinacol del ácido 4-aminofenilborónico (87 mg, 398 μmol , 0,91 equiv.), carbonato sódico (213 mg, 2,0 mmol, 4,6 equiv.), y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (20 mg, 17,5 μmol , 0,04 equiv.), la reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno con seguimiento mediante CL-EM. Después de tres horas la reacción había avanzado hasta aproximadamente una conversión del 50 % hasta el producto. La reacción se concentró y después se repartió entre acetato de etilo (100 ml) y agua (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 anilina triflato **15** bruta. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con mezclas de hexanos:acetato de etilo (60:40 a 30:70), para proporcionar anilina triflato **15** pura (118 mg, 25 %). CCF: $F_r = 0,43$, 25 % hexanos en acetato de etilo. CLEM: t_R 8,30 min, m/z (ES^+) observado 1088,2 ($\text{M}+\text{H}^+$).

(b) (S)-2-(4-aminofenil)-8-((5-(((S)-2-(4-(3-dimetilamino)propoxi)fenil)-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)pentil)oxi)-7-metoxi-10-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H, 11aH)-diona (16)

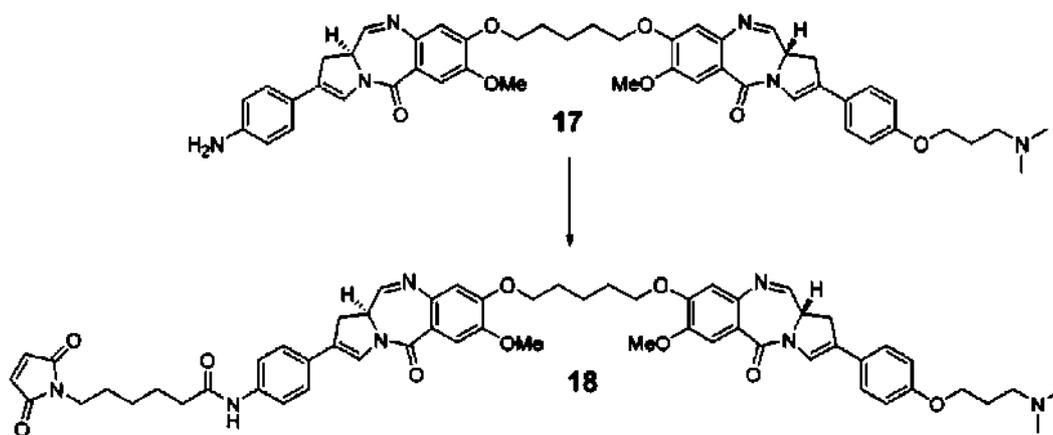
Un matraz se cargó con anilina triflato **15** (118 mg, 109 μmol , 1 equiv.) disuelta en tolueno (0,7 ml), etanol (2,3 ml), y agua (0,3 ml). A la solución agitada se añadió éster de pinacol del ácido 4-[3-(dimetilamino)propiloxi]fenilborónico (43 mg, 142 μmol , 1,3 equiv.), carbonato sódico (53 mg, 0,5 mmol, 4,6 equiv.), y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (5 mg, 4,4 μmol , 0,04 equiv.), la reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno con seguimiento mediante CL-EM. Después de cuatro horas la reacción había llegado a la finalización. La reacción se concentró y después se repartió entre acetato de etilo (25 ml) y agua (25 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (25 ml). A continuación, la capa orgánica se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad para proporcionar dilactama SEM **16** bruta. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con mezclas de hexanos:acetato de etilo (50:50 a 0:100), para proporcionar el producto puro **16** (78 mg, 64 %). CCF: $F_r = 0,38$, metanol al 20 % en CH_2Cl_2 . CL-EM: m/z (ES^+) observado 1117,8 ($\text{M}+\text{H}^+$). RMN ^1H ($\text{d}_7\text{-DMF}$) δ (ppm) 0,00 (s, 18H), 0,90 (m, 4H), 1,74 (m, 3H), 1,96 (m, 6H), 2,21 (s, 6H), 2,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,25 (m, 2H), 3,62 (m, 4H), 3,80 (m, 2H), 3,96 (s, 5H), 4,11 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 4,20 (m, 3H), 4,92 (m, 2H), 5,31 (dd, $J = 6, 10$ Hz, 2H), 5,48 (m, 4H), 6,73 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,01 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,29 (m, 3H), 7,40 (m, 4H), 7,47 (m, 1H), 7,56 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H).

(c) (S)-2-(4-aminofenil)-8-((5-(((S)-2-(4-(3-(dimetilamino)propoxi)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-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (17)

Un matraz secado a la llama se cargó con dilactama SEM **16** (70 mg, 63 μmol , 1 eq) disuelta en tetrahidrofurano

anhidro (1,3 ml), y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota trietilborohidruro de litio (0,13 ml de una solución 1 M en THF, 126 µmol, 2 equiv.) se añadió gota a gota y la reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 h, momento en el cual la CL reveló una conversión incompleta en producto. Se añadieron 65 µl del reductor y la reacción se agitó durante una hora más. La reacción se interrumpió por 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 secaron con sulfato de sodio, y se evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió en una mezcla de diclorometano (1,2 ml), etanol (3,2 ml), y agua (0,5 ml), y se añadió gel de sílice (1,6 g). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El análisis de CCF reveló la conversión a dímero de imina **17**, 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 **17**. El material se disolvió en diclorometano mínimo y se purificó por cromatografía radial sobre una placa de cromatotrón de 1 mm eluída con mezclas CH₂Cl₂/MeOH (100:0 a 60:40) para proporcionar **17** (31 mg, 60 %). CL-EM: t_R 11,14 min, m/z (ES⁺) observado 825,4 (M+H)⁺.

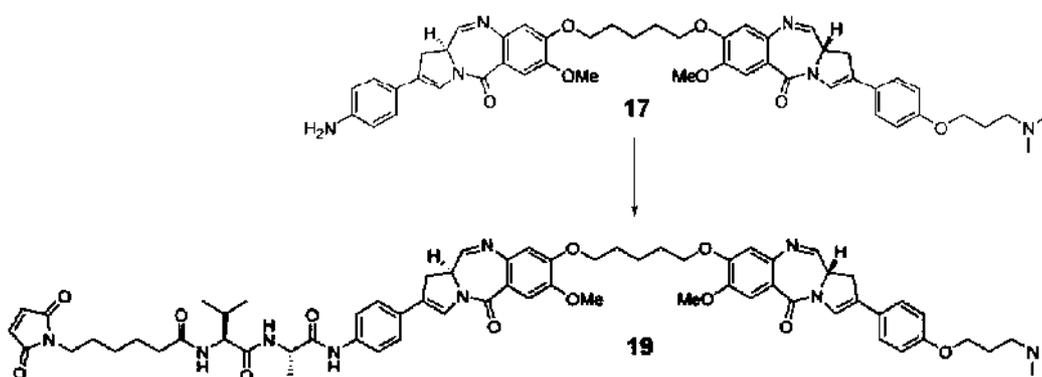
Ejemplo 6



N-(4-((*S*)-8-((5-(((*S*)-2-(4-(3-(dimetilamino)propoxi)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1*H*-benzo[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1*H*-benzo[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-2-il)fenil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)hexanamida (**18**)

Un matraz secado a la llama se cargó con ácido maleimidocaproico (5,2 mg, 25 µmol, 1,5 equiv.) disuelto en 0,33 ml de metanol al 5 % en diclorometano anhidro. El ácido fue activado previamente mediante la adición de *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (7,3 mg, 30 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 **17** (13,5 mg, 16 µmol, 1 eq). La reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno, momento en el cual la CL-EM reveló la conversión en producto. El material se diluyó con diclorometano y se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón de 1 mm eluída con mezclas de CH₂Cl₂/MeOH (100:0 a 80:20) para proporcionar **18** (7,3 mg, 44 %). CL-EM: t_R 9,09 min, m/z (ES⁺) observado 1018,3 (M+H)⁺.

Ejemplo 7

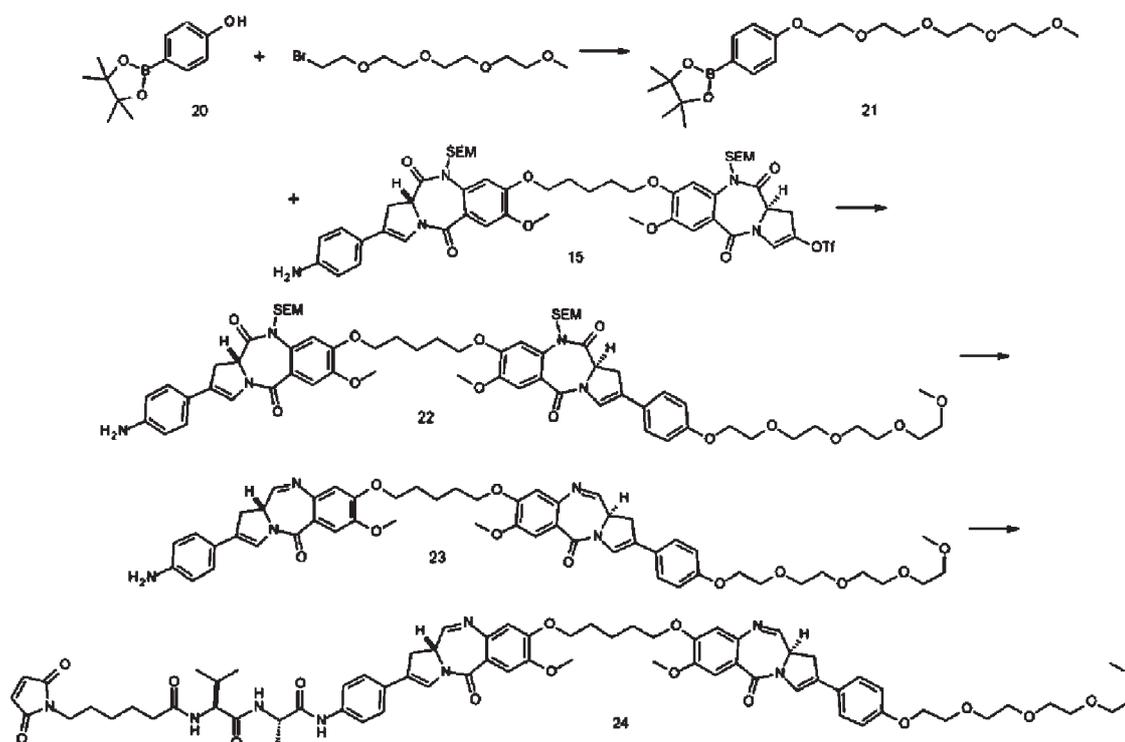


N-((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-((*S*)-8-((5-(((*S*)-2-(4-(3-(dimetilamino)propoxi)fenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1*H*-

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)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida (19)

- 5 Un matraz secado a la llama se cargó con enlazador de maleimidocaproil-valina-alanina (compuesto 36 del Ejemplo 13 del documento WO 2011/130613 A1) (9 mg, 24 μ mol, 1,5 eq) disuelto en 0,33 ml de metanol al 5 % en diclorometano anhidro. El ácido fue activado previamente mediante la adición de *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (7,1 mg, 29 μ mol, 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 **17** (13 mg, 16 μ mol, 1 eq). La reacción se agitó durante 7 h a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno, momento en el cual la 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 CH₂Cl₂/MeOH (100:0 a 80:20) para proporcionar **19** (5,1 mg, 27 %). CL-EM: *t*_R 9,09 min, *m/z* (ES⁺) observado 1188,4 (M+H)⁺.

15 Ejemplo 8



20

(a) 2-(4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)fenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (21)

- A una mezcla de éster de pinacol del ácido 4-hidroxifenilborónico (880 mg, 4 mmol), bromometiltetraetilenglicol (1,6 g, 6 mmol) y DMF (10 ml) se añadió Cs₂CO₃ (1,5 g; 8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante -65 h, y se vertió en acetato de etilo (100 ml). La mezcla se lavó con HCl 0,1 N (200 ml), agua (3 x 100 ml) y salmuera (50 ml) y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄. La decantación y la concentración proporcionaron un aceite de color pardo que se purificó en una placa de cromatotrón radial de 2 mm eluída con acetato de etilo al 50 % en hexanos seguido de acetato de etilo al 100 % para dar 1,21 g (74 %): RMN (d₆-DMSO, 400 MHz) 7,59 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,11 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,60-3,45 (m, 14H), 3,41 (m, 2H), 3,23 (s, 3H), 1,27 (s, 12H); CL-EM: *m/z* (ES⁺) observado 433,64 (M+Na)⁺.

30

(b) (R)-2-(4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)fenil)-8-((5-(((R)-2-(4-aminofenil)-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)pentil)oxi)-7-metoxi-10-((2-trimetilsilil)etoxi)metil)-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepina-5,11(10H, 11aH)-diona (22)

35

- A una mezcla del monotriflato **15** (200 mg, 0,18 mmol) y éster de boronato TEG (111 mg, 0,27 mmol) en una mezcla de tolueno (2 ml) y etanol (1 ml) se añadió Na₂CO₃ 2 M (0,5 ml) y tetraquis Pd (6 mg, 0,054 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 h, la mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo, se lavó con agua (3 x 50 ml) y salmuera (50 ml) y se secó con Na₂SO₄. La solución se decantó, se concentró y después se purificó en una placa de cromatotrón radial de 2 mm eluída con metanol al 5 % en diclorometano. Esto produjo 207 mg (94 %) en forma de un sólido de color amarillo: RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) \square 7,39-7,34 (m, 7H), 7,26 (m, 2H), 6,89 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 6,66 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,70 (dd, J = 10,2, 2,0 Hz, 2H), 4,18-4,03 (m, 8H), 3,93 (s, 3H), 3,90-3,62 (m, 21 H),

40

3,55 (dd, J = 5,1, 3,2 Hz, 2H) 3,38 (s, 3H), 3,12 (pent, J = 5,0H, 2H), 2,05 (m, 6H), 1,72 (m, 2H), 1,0 (m, 4H), 0,3 (s, 18 H); CLEM: *m/z* (ES+) observado 1222,98 (M+H)⁺.

5 (c) (R)-2-(4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)fenil)-8-((5-(((R)-2-(4-aminofenil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-7-metoxi-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona (23)

10 A una mezcla de la dilactama SEM (207 mg, 0,17 mmol) en THF (10 ml) a -78 °C se añadió Superhidruro (LiHBEt₄ en forma de una solución 1 N en THF. 0,34 ml, 0,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 2 h, momento en el que el análisis por CL-EM de la mezcla de reacción reveló una conversión de aproximadamente el 50 % al intermedio de SEM-carbinoamina completamente reducida, como material monorreducido aún presente. Se añadió una alícuota adicional de Superhidruro (0,34 ml, 0,34 mmol) y la reacción se agitó a -78 °C durante una hora más. La inspección por CL-EM reveló que la reacción aún no había progresado hasta su finalización, por tanto, se añadió una tercera alícuota de Superhidruro (0,34 ml, 0,34 mmol) y la mezcla de reacción se introdujo en un congelador a -80 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se inactivó después con agua (5 ml), se dejó calentar a temperatura ambiente y se vertió en acetato de etilo (100 ml). Después de lavar con salmuera, la mezcla se secó con Na₂SO₄. La fase orgánica se decantó, se concentró a presión reducida, y posteriormente se trató con una mezcla de etanol (14 ml) diclorometano (5 ml), agua (7 ml) y gel de sílice (5 g) durante 72 horas. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio con placa fritada y se lavó varias veces metanol al 10 % metanol en diclorometano, antes de concentrar la solución a presión reducida. La mezcla se purificó en una placa de cromatotrón radial de 2 mm eluida con metanol al 5 % metanol en diclorometano para dar 46 mg (29 %): CLEM: *m/z* (ES+) observado 930,85 (M+H)⁺.

25 (d) N-(((S)-1-(((S)-1-((4-(((R)-8-((5-(((R)-2-(4-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-iloxi)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)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida (24)

30 A una mezcla del mc-val-ala-OH (50 mg, 0,129 mmol) en metanol al 5 % en diclorometano (1 ml) a 0 °C se añadió EEDQ (32 mg, 0,129 mmol). La mezcla se agitó durante 15 min, y a continuación se añadió una solución de la anilina (44 mg, 0,044 mmol) en metanol al 5 % en diclorometano (1 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 3 horas, se diluyó con diclorometano (2 ml) y se aspiró directamente sobre una placa de cromatotrón radial de 2 mm. El producto se eluyó con un gradiente de metanol 2,5 % al 5 % en diclorometano para dar 22,5 mg (40 %): CL-EM: *m/z* (ES+) observado 1294 (M+H)⁺.

35

Ejemplo 9 - Preparación de conjugados de dímeros de PBD

40 Anticuerpos con cisteínas introducidas: Los anticuerpos frente a CD70 que contienen un resto de cisteína en la posición 239 de la cadena pesada se redujeron totalmente 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 naturales, 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 propio anticuerpo se diluyó primero con propilenglicol hasta una concentración final del 33 % (por ejemplo, si la solución de anticuerpo estaba en un volumen de reacción de 60 ml, se añadieron 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 la mezcla, se añadió la solución del enlazador de fármaco PBD en propilenglicol a la solución 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. (Se debe tener 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).

55

Ejemplo 10: Determinación de la actividad *in vitro* de conjugados seleccionados

60 La actividad citotóxica *in vitro* del conjugado de anticuerpo-fármaco seleccionado se evaluó usando un ensayo de reducción de resazurina (Sigma, St. Louis, Mo., EE.UU.) (Referencia: Doronina et al., *Nature Biotechnology*, 2003, 21, 778-784). El conjugado anticuerpo-fármaco se preparó como se ha descrito anteriormente.

65 Para el ensayo de 96 horas, se sembraron 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 medio de cultivo de células en concentración de trabajo 4x; se añadieron 50 µl de cada dilución 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 determinar la extensión de la reducción del colorante en un lector de placa de fusión HT (Packard Instruments, Meridien, CT, EE.UU.) con longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 590 nm, respectivamente. El valor de Cl_{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 la tabla siguiente, se muestra la citotoxicidad *in vitro* de los CAF usando el ensayo de 96 horas. Los CAF se ensayaron de nuevo frente a líneas celulares de antígeno positivas y negativas, h1F6 es el anticuerpo humanizado anti-CD70 descrito a continuación.

Actividad *in vitro*

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

compuesto	786-O	Caki-1	HL60	HEL9217
17	7	2	3	2
23	100	100	40	100

Tabla 2 - Cl_{50} en pM después de un tratamiento de 96 horas

CAF	fármacos/Ab	786-O	Caki-1	línea celular de negativa para el antígeno
h1F6ec-6	1,8	260	12	28.000
h1F6ec-9	1,5	120	4,9	60.000
h1F6ec-14	1,8	380	24	20.000

Tabla 3 - Cl_{50} en pM después de un tratamiento de 96 horas

CAF	fármacos/Ab	786-O	Caki-1	UMRC3	línea celular de negativa para el antígeno
h1F6ec-18	1,9	540	63	1000	4000
h1F6ec-19	1,9	13	3,8	25	2000
h1F6ec-24	2,0	30	8	-	3000

Ejemplo 11: Determinación de la citotoxicidad *in vivo* de conjugados seleccionados

Se llevaron a cabo todos los estudios de acuerdo con el Animal Care and Use Committee en una instalación que está totalmente acreditada por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care. La tolerabilidad del 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, una IgG1 de h1F6 humanizada (WO2006/113909), con una mutación puntual que sustituye la cisteína por la serina en la posición 239. La conjugación con la unidad de fármaco se realiza 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+. Los fragmentos del tumor (Caki-1) se implantaron en el flanco derecho de ratones atímicos. Los ratones se aleatorizaron a los grupos de estudio (n=5 (786-0) donde cada grupo promedia aproximadamente 100 mm³. El CAF o los controles se dosificaron *ip* de acuerdo con el calendario indicado. El volumen del tumor en función del tiempo se determinó usando la fórmula $(L \times W^2)/2$. Los animales se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 1000 mm³. Los ratones que muestran regresiones duraderas se sacrificaron alrededor del día 100 después del implante.

En referencia a la Figura 1, se muestran los resultados de un estudio de tratamiento usando un conjugado h1F6-compuesto 18 y un conjugado h1F6-compuesto 19 en un modelo de carcinoma de células renales CD70+. La dosificación se realizó a q7d x 2. En la figura, * es no tratado, ■ es tratamiento con h1F63c-18 a 0,1 mg/kg, □ es tratamiento con h1F63c-18 a 0,3 mg/kg, ▲ es tratamiento con h1F63c-19 a 1 mg/kg, Δ es tratamiento con h1F63c-19 a 3 mg/kg.

Los resultados de un experimento de tolerabilidad en ratones con un conjugado h1F6-compuesto 6 demostró que una sola dosis de CAF a 1 mg/kg era bien tolerada sin signos de pérdida de peso ni morbilidad al cabo de 30 días. La administración de una dosis más alta (2,5 mg/kg) dio como resultado la pérdida de peso.

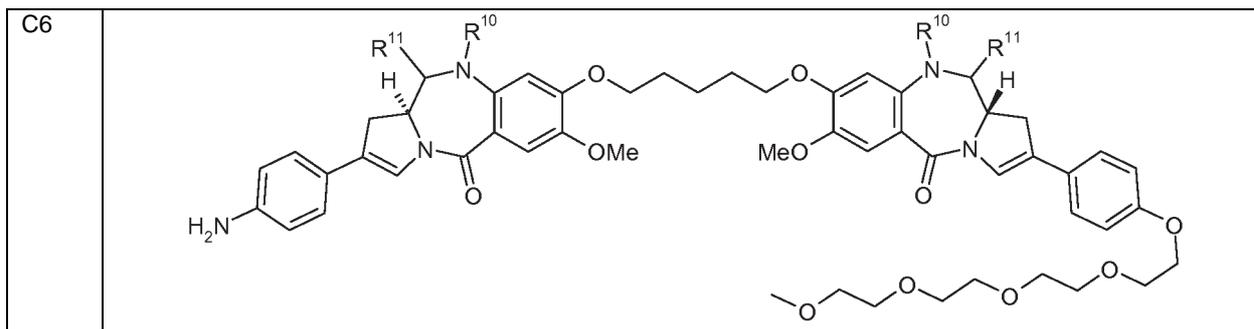
en el que:

- (a) R^{10} es H y R^{11} es OH, OR^A , donde R^A es alquilo C_{1-4} saturado;
 (b) R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los que están unidos; o
 (c) R^{10} es H y R^{11} es SO_2M , donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable, o ambos M conjuntamente son un catión divalente farmacéuticamente aceptable.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^{10} y R^{11} forman un enlace doble nitrógeno-carbono.

3. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

C1	
C2	
C3	
C4	
C5	



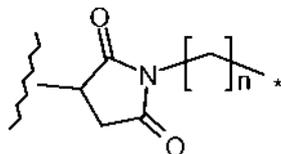
en la que cualquiera de

- 5 (a) R^{10} es un grupo carbamato protector de nitrógeno y R^{11} es O-Prot^O, en donde Prot^O es un grupo protector de oxígeno; o
 (b) R^{10} es un grupo protector de nitrógeno hemiaminal y R^{11} es un grupo oxo.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que R^{10} es Troc y/o R^{11} es OTBS.
- 10 5. Un compuesto de acuerdo con 3, en el que R^{11} es oxo y R^{10} es SEM.
6. Un conjugado que tiene la fórmula IV:

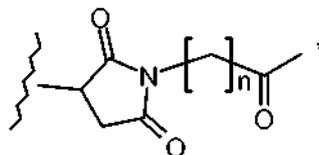


o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo;
 en donde L es una unidad de ligando seleccionada entre un anticuerpo y un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo,

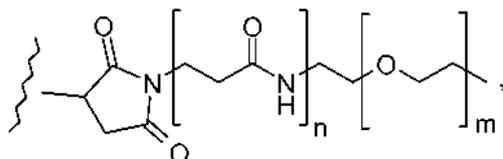
20 LU es una unidad de enlazador que es -A¹-L¹-, en donde A¹ se selecciona entre:



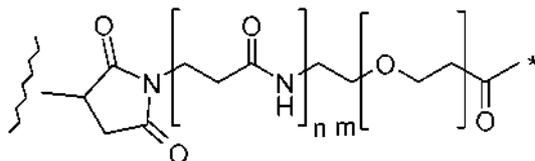
25 donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando y n es 0 a 6;



30 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 de 0 a 6;



35 donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30; o

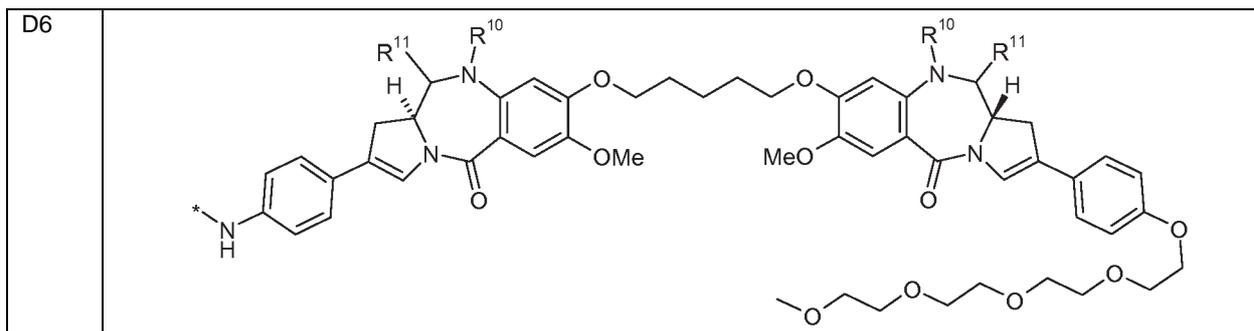


donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, la línea ondulada indica el punto de unión a la unidad de ligando, n es 0 o 1 y m es 0 a 30; y

5 L¹ comprende una secuencia de aminoácidos que se puede escindir mediante la acción de una enzima, p es de 1 a 20; y

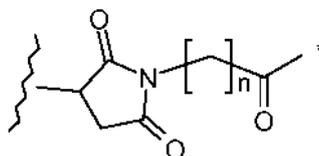
D se selecciona entre el grupo que consiste en:

D1	
D2	
D3	
D4	
D5	



donde R^{10} y R^{11} son como se han definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, y el asterisco indica el punto de unión a la unidad de ligando.

- 5 7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que A^1 es:



- 10 donde 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 de 0 a 6.

8. El conjugado de la reivindicación 6, en el que L^1 comprende una secuencia de aminoácidos, que es un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en valina-alanina, valina-citrulina y fenilalanina-lisina.

- 15 9. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o una enfermedad autoinmunitaria.

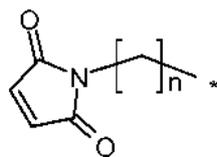
- 20 10. El conjugado de la reivindicación 9 en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer y el cáncer es una neoplasia hematológica, especialmente leucemias y linfomas, especialmente linfoma no de Hodgkin, y subtipos tales como LDCGB, zona marginal, zona del manto y folicular, linfoma de Hodgkin, LMA y otros cánceres de origen en linfocitos B o de origen en linfocitos T.

- 25 11. El conjugado de la reivindicación 9 en el que la enfermedad proliferativa es un cáncer y 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 de testículos, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi o melanoma.

12. Un enlazador de fármaco de fórmula V:

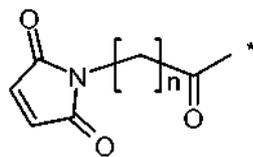
- 30 LU-D (V)

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde LU es una unidad de enlazador que es G^1-L^1 , en donde G^1 se selecciona entre:



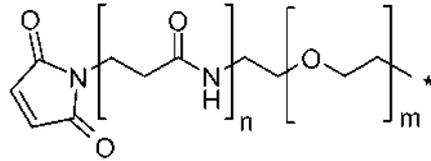
- 35

donde el asterisco indica el punto de unión a L^1 y n es de 0 a 6;

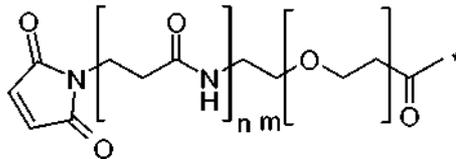


- 40

donde el asterisco indica el punto de unión a L¹ y n es de 0 a 6;

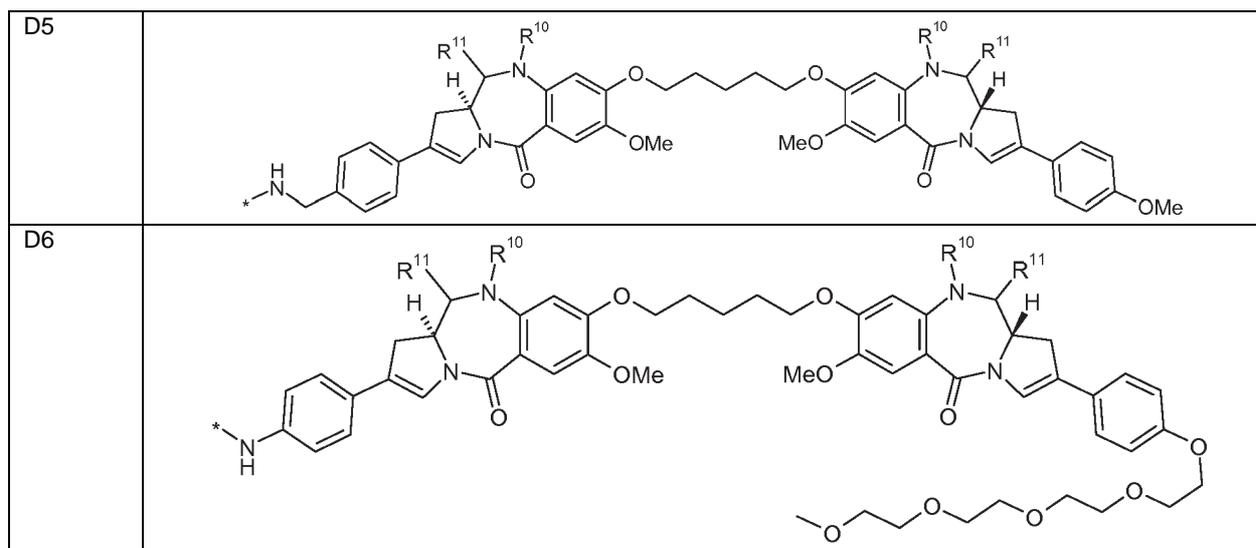


5 donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30;



10 donde el asterisco indica el punto de unión a L¹, n es 0 o 1 y m es de 0 a 30;
L¹ comprende una secuencia de aminoácido que es escindible mediante la acción de una enzima, y D se selecciona del grupo que consiste en:

D1	
D2	
D3	
D4	



donde R^{10} y R^{11} son como se han definido en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, y el asterisco indica el punto de unión a la unidad de ligando.

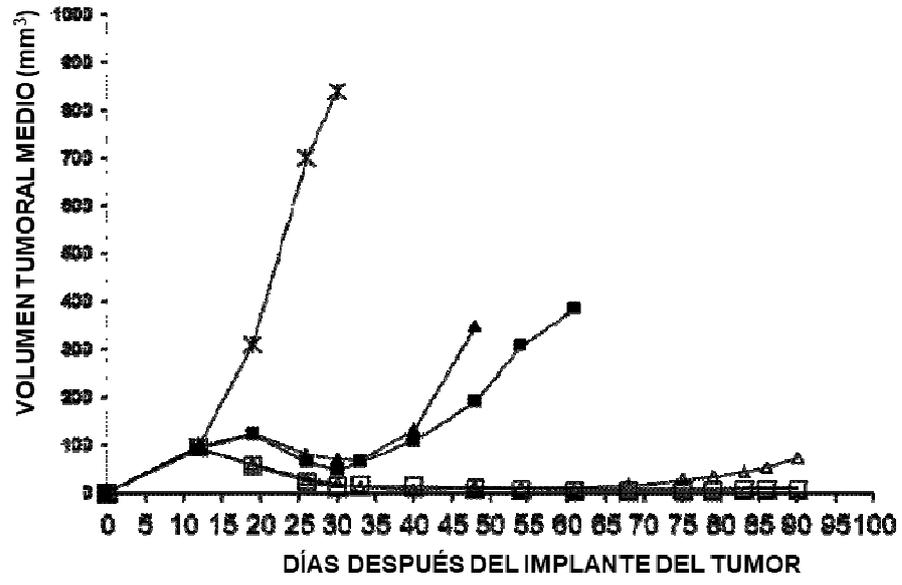


Fig. 1