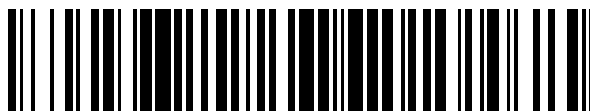


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 779**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/IB2014/001029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14741363 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2968594**

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

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361778777 P

19.07.2013 US 201361856351 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2019

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**HOWARD, PHILIP, WILSON;
FLYGARE, JOHN, A.;
PILLOW, THOMAS y
WEI, BINQING**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 731 779 T3

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

DESCRIPCIÓN

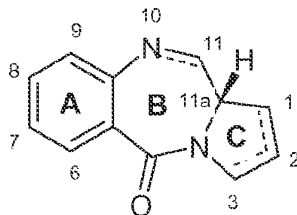
Pirrolobenzodiazepinas y conjugados de las mismas

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular a pirrolobenzodiazepinas que tienen un grupo enlazador conectado a un agente aglutinante de células.

Antecedentes de la invención

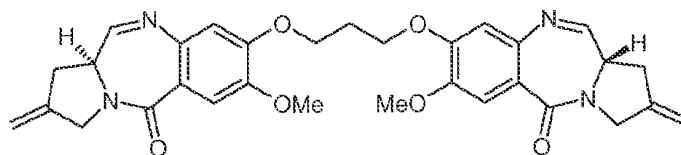
10 Pirrolobenzodiazepinas

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



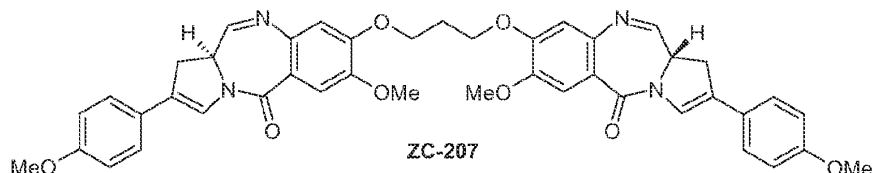
Se diferencian en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como en los anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un metil éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de alquilar el ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro a la derecha cuando se ven desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional adecuada para la isohelicidad con el surco menor del ADN de la forma B, lo que conduce a un ajuste ceñido en el sitio de unión (Kohn, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975); Hurley y 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.

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



SJG-136

45 Se han descrito otros compuestos de PBD diméricos, tal como los que portan sustituyentes de arilo C2 en el documento WO 2005/085251, siendo un ejemplo:



ZC-207

Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos altamente útiles.

Conjugados de anticuerpo-fármaco

- 5 Se ha establecido la terapia con anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos (Cárter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer, se dirige a la administración de los restos de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en el mismo, mientras que la administración sistémica de estos agentes de fármaco no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como a células tumorales que se desean eliminar (Xie y col. (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun y col. (2006) *Cáncer Res.* 66(6):3214-3121; Law y col. (2006) *Cáncer Res.* 66(4):2328-2337; Wu y col. (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambed J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9): 1087-1103; Payne, G. (2003) *Cáncer Cell* 3:207-212; Trail y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

Así se busca máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han basado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAb), además del mecanismo de acción del fármaco, enlace del fármaco, relación de fármaco/anticuerpo (carga) y propiedades de liberación de fármaco (Junutula, ycol., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Doman y col. (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; documento WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Doronina y col. (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson y col (2006) *Cancer Res.* 66(8): 1-8; Sanderson y col (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey y col (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett y col (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Los restos de fármaco pueden conferir sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteína.

El documento WO2010/091150 desvela ADC que comprenden indolinobenzodiazepinas diméricas.

PBD en ADC

Se han descrito PDB diméricos como los fármacos en conjugados de fármacos. Por ejemplo, en el documento WO 2011/130598, se han descrito compuestos de PDB que tienen grupos enlazadores para la conexión a un agente aglutinante de células, tal como un anticuerpo, en donde el grupo enlazador se une a una de las posiciones N10 disponibles y se escinden generalmente por acción de una enzima en el grupo enlazador.

Por el contrario, en los documentos documento WO 2011/130613 y documento WO 2011/130616, se han descrito compuestos de PDB que tienen grupos enlazadores para la conexión a un agente aglutinante de células, tal como un anticuerpo, en donde el grupo enlazador se une a través de un grupo aromático en una de las posiciones C2 y se escinden generalmente por acción de una enzima en el grupo enlazador. Tales conjugados de anticuerpo y fármaco se describen también en Flyagre, J., y col., *Chem. Biol. Drug Des.* 81: 113-121 (2013), que también describe otros tipos de conjugados de anticuerpo y fármaco.

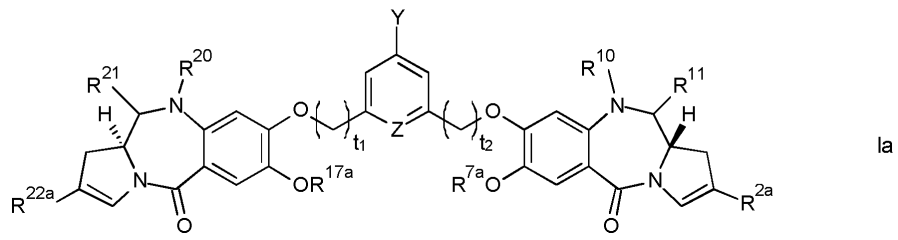
También se describe un enfoque adicional en el documento WO 2007/085930, en donde los dímeros similares a tomamicina tienen un grupo enlazador para la conexión a un agente aglutinante de células, tal como un anticuerpo, en donde el grupo enlazador se une a la atadura entre las unidades de tomamicina y se escinden generalmente por acción de una enzima en el grupo enlazador.

Los presentes inventores han desarrollado un enfoque novedoso con respecto a la formación de conjugados de PBD con agentes aglutinantes de células y en particular conjugados de anticuerpo de PBD.

Sumario de la invención

En un aspecto general, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de dímero de PBD con un enlazador para conectarse a un agente de unión a célula, en el que el enlazador tiene un grupo triazol, piperazina, propargileno u oxima unido a un fenileno o piridileno en el puente que enlaza los dos monómeros de PBD. El agente de unión a célula es preferentemente un anticuerpo.

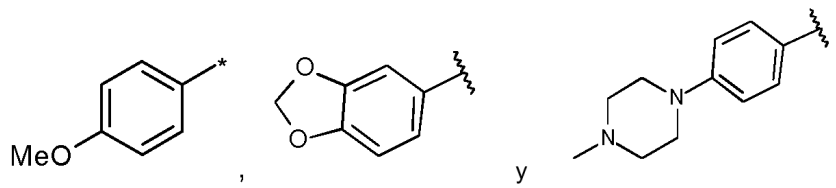
En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos conjugados novedosos de fórmula (Ia):



en la que:

5 R^{2a} y R^{22a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

(ia)



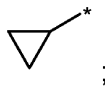
10

(ib)



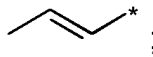
15

(ic)

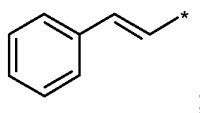


20

(id)



(ie)



25

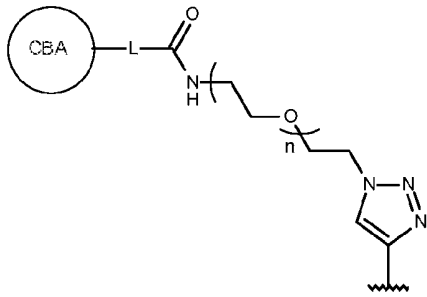
e

(if)

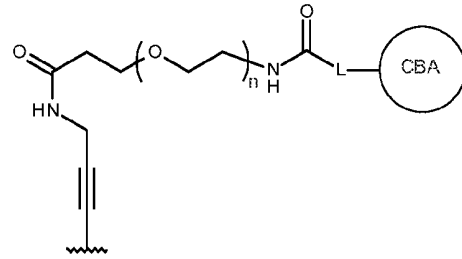


30

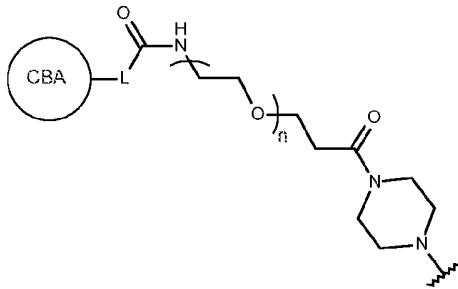
R^{7a} y R^{17a} se seleccionan independientemente de metilo y fenilo;
Y se selecciona de las fórmulas A1, A2, A3, A4, A5 y A6:



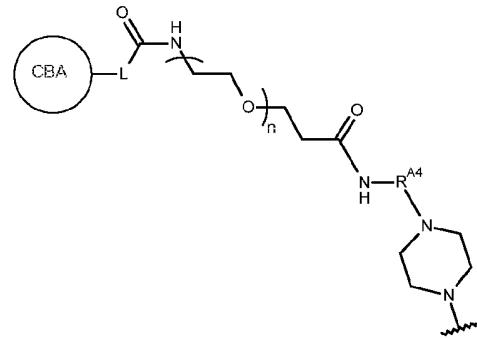
(A1)



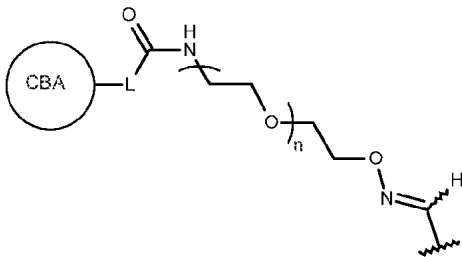
(A2)



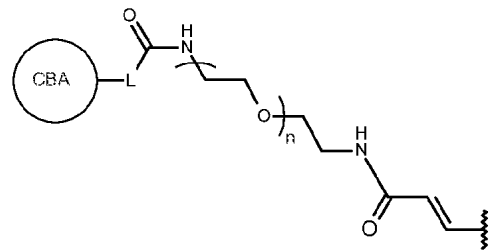
(A3)



(A4)



(A5)



(A6)

5

L es un enlazador conectado a un agente de unión celular;
 CBA es el agente de unión celular;
 n es un número entero seleccionado en el intervalo de 0 a 48;
 R^{A4} es un grupo alquileo C₁₋₆;
 bien

10

(a) R¹⁰ es H y R¹¹ es OH, OR^A, donde R^A es alquilo C₁₋₄; o

(b) R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que se unen; o

(c) R¹⁰ es H y R¹¹ es OSO₂M, donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

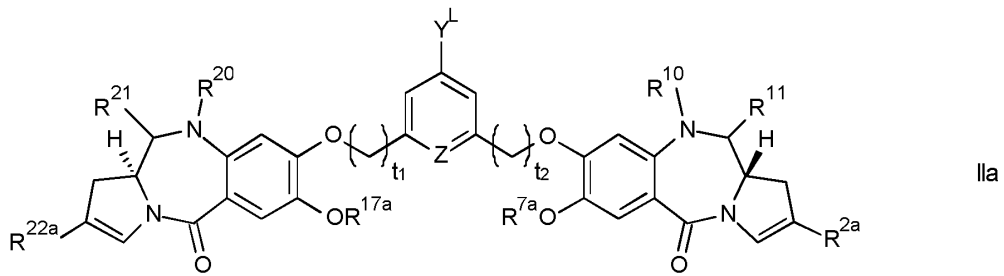
15

en la que R²⁰ y R²¹ son como se definen para R¹⁰ y R¹¹ respectivamente;

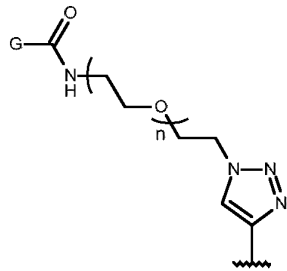
en la que Z es CH o N; y t₁ y t₂ se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2.

20

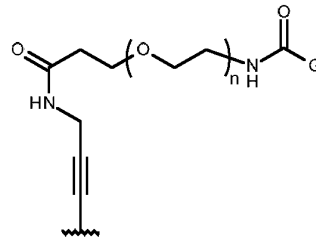
Un segundo aspecto de la presente invención proporciona novedosos compuestos de fármaco-enlazador de fórmula (IIa):



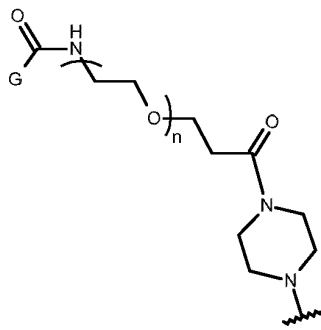
en la que R^{2a}, R^{7a}, R¹⁰, R¹¹, R^{17a}, R²⁰, R²¹, R^{22a}, Z, t₁ y t₂ son como se define en el primer aspecto de la invención;
 e
 5 Y^L se selecciona de un grupo de fórmulas B1, B2, B3, B4, B5 y B6:



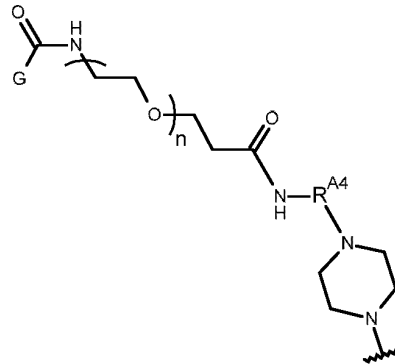
(B1)



(B2)

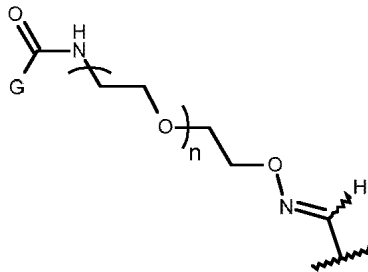


(B3)

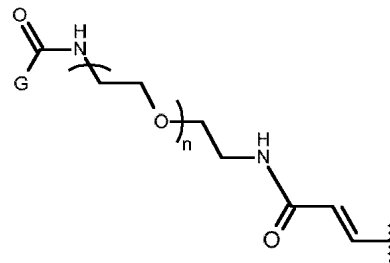


(B4)

10



(B5)

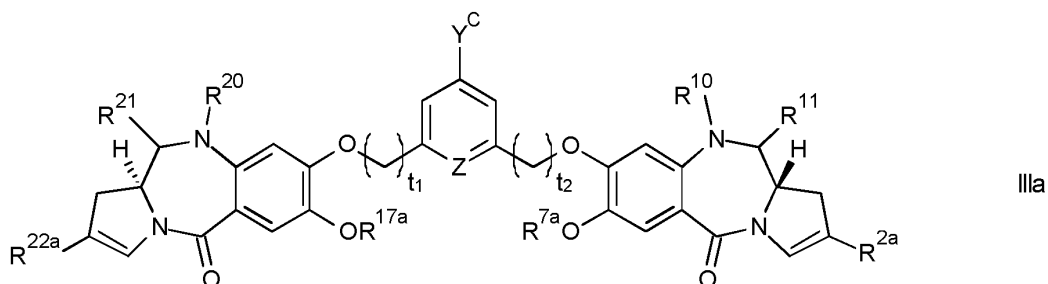


(B6)

donde G es un grupo reactivo para conectar a un agente de unión celular; y n y R^{A4} son como se definen en el primer aspecto de la invención.

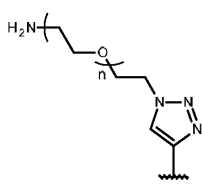
15

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona compuestos de fórmula (Ila) que pueden usarse en la preparación de los compuestos y los compuestos conjugados de la invención:

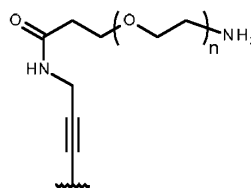


en la que R^{2a}, R^{7a}, R¹⁰, R¹¹, R^{17a}, R²⁰, R²¹, R^{22a}, Z, t₁ y t₂ son como se define en el primer aspecto de la invención;

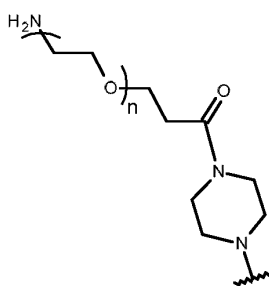
5 e Y^C se selecciona de un grupo de fórmulas C1, C2, C3, C4, C5 y C6:



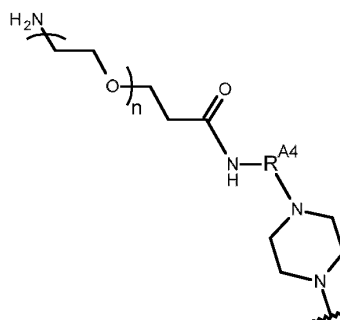
(C1)



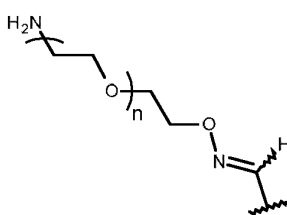
(C2)



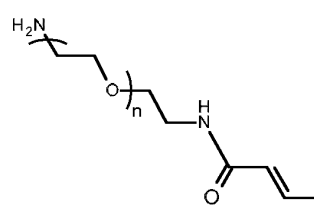
(C3)



(C4)



(C5)



(C6)

en las que n y R^{A4} son como se define en el primer aspecto de la invención.

15 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto del primer aspecto y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona un compuesto del primer aspecto de la invención o una
20 composición farmacéutica del cuarto aspecto de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa.

Un sexto aspecto de la presente invención proporciona un método de síntesis de un compuesto del primer aspecto de la presente invención, que comprende la etapa de conjugar un enlazador de fármacos del segundo aspecto con un agente de unión celular.

25 También se describe en el presente documento la síntesis de compuestos del segundo aspecto de la invención a partir de compuestos del tercer aspecto de la invención haciéndolos reaccionar con reactivos adecuados.

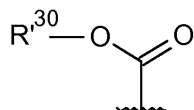
Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un conjugado que comprende un dímero de PBD conectado a través de la porción de formación de puente dimérica a través de un enlazador especificado a un agente de unión celular.

La presente invención es adecuada para su uso proporcionando un conjugado de PBD a un sitio preferido en un sujeto.

Grupos protectores de nitrógeno

Los grupos protectores de nitrógeno se conocen bien en la técnica. Los grupos protectores de nitrógeno preferidos para su uso son grupos protectores de carbamato que tienen la fórmula general:



en la que R^{30} es un grupo alquilo (por ejemplo, alquilo C_{1-20}), arilo (por ejemplo, arilo C_{5-20}) o heteroarilo (por ejemplo, heterociclilo C_{3-20}) opcionalmente sustituidos.

Un gran número de posibles grupos protectores de nitrógeno de carbamato se listan en las páginas 706 a 772 de Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc., 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1).

Los grupos protectores particularmente preferidos incluyen Alloc, Troc, Teoc, BOC, TcBOC, Fmoc, 1-Adoc y 2-Adoc.

Grupos protectores de hidroxilo

Los expertos en la técnica conocen bien los grupos protectores de hidroxilo. Se hace referencia concreta a la divulgación de grupos protectores adecuados en Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, cuarta edición, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), páginas 16-298.

Las clases de particular interés incluyen éteres de sililo, éteres de metilo, éteres de alquilo, éteres de bencilo, ésteres, benzoatos, carbonatos y sulfonatos. Los grupos protectores de hidroxilo particularmente preferidos incluyen THP.

Preferencias

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

N10-C11

En algunas realizaciones, R^{10} es H y R^{11} es OH, OR^{A} , donde R^{A} es alquilo C_{1-4} . En algunas de estas realizaciones, R^{11} es OH. En otras de estas realizaciones, R^{11} es OR^{A} , donde R^{A} es alquilo C_{1-4} . En algunas de estas realizaciones, R^{A} es metilo.

En algunas realizaciones, R^{10} y R^{11} forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los cuales están unidos.

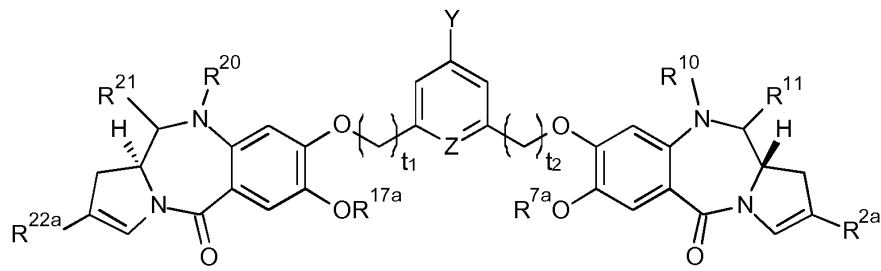
En algunas realizaciones, R^{10} es H y R^{11} es OSO_2M , donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable. En algunas de estas realizaciones, M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable y puede ser Na^+ . Además, en algunas realizaciones z es 3.

Las preferencias anteriores se aplican igualmente a R^{20} y R^{21} .

Dímeros

En algunas realizaciones, los grupos $\text{R}^{22\text{a}}$, $\text{R}^{17\text{a}}$, R^{20} y R^{21} son los mismos que los grupos $\text{R}^{2\text{a}}$, $\text{R}^{7\text{a}}$, R^{10} y R^{11} respectivamente. En estas realizaciones, las unidades monoméricas PBD tienen los mismos sustituyentes.

Los compuestos del primer aspecto de la presente invención son de fórmula la:

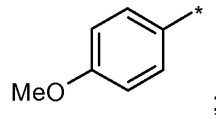


la

donde

- 5 R^{10} , R^{11} , R^{20} , R^{21} e Y son como se han definido anteriormente;
 t_1 y t_2 se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2;
 R^{7a} y R^{17a} se seleccionan independientemente de metilo y fenilo;
 R^{2a} y R^{22a} se seleccionan independientemente de:

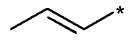
10 (a)



15 (b)

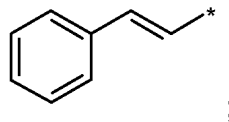


(c)



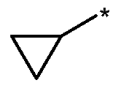
20

(d)



25

(e)



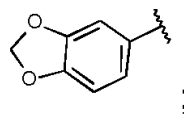
30

(f)



35

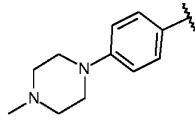
(g)



y

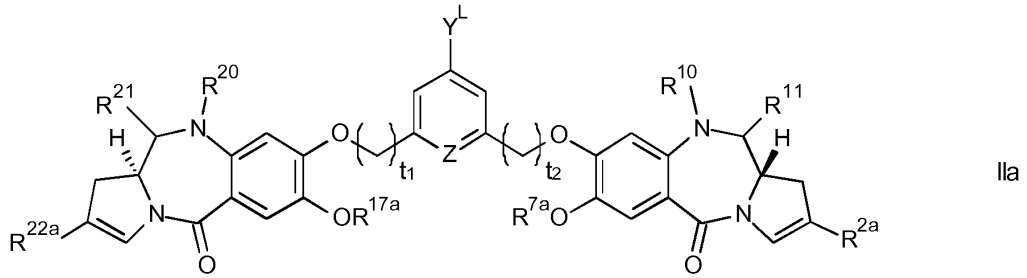
40

(h)



Estos compuestos pueden ser preferentemente simétricos.

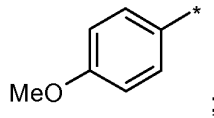
5 Los compuestos del segundo aspecto de la presente invención son de fórmula IIa:



donde

- 10 R¹⁰, R¹¹, R²⁰, R²¹ e Y^L son como se han definido anteriormente;
 t₁ y t₂ se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2;
 R^{7a} y R^{17a} se seleccionan independientemente de metilo y fenilo;
 R^{2a} y R^{22a} se seleccionan independientemente de:

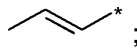
(a)



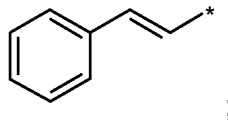
20 (b)



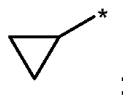
(c)



(d)



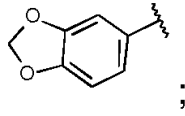
30 (e)



35 (f)

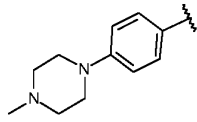


40 (g)



y

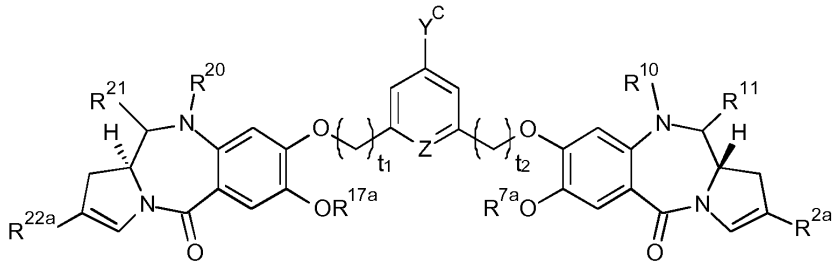
5 (h)



Estos compuestos pueden ser preferentemente simétricos.

10

Los compuestos del tercer aspecto de la presente invención son de fórmula IIIa:



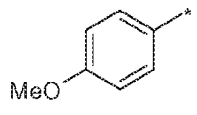
IIIa

15 donde

R¹⁰, R¹¹, R²⁰, R²¹ e Y^C son como se han definido anteriormente;
 t₁ y t₂ se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2;
 R^{7a} y R^{17a} se seleccionan independientemente de metilo y fenilo;
 R^{2a} y R^{22a} se seleccionan independientemente de:

20

(a)



25

(b)



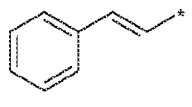
30

(c)

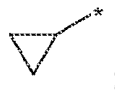


35

(d)

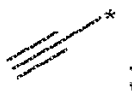


(e)



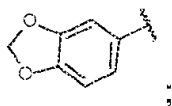
40

(f)



5

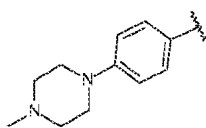
(g)



10

y

(h)



15 Estos compuestos pueden ser preferentemente simétricos.
 n (Y, Y^L)

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es un número entero entre 0 y 24.

20 En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es un número entero entre 0 y 12.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es un número entero entre 0 y 8.

25 En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es un número entero entre 0 y 6.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 0.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 1.

30 En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 2.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 3.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 4.

35

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 5.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 6.

40 En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 7.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 8.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 9.

45

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 10.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 11.

50 En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 12.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 13.

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 14.

55

En algunas realizaciones, n (en Y o Y^L) es 15.

En algunas realizaciones cuando Y es A1 o Y^L es B1, n puede seleccionarse de 3 y 6.

En algunas realizaciones cuando Y es A2 o Y^L es B2, n puede seleccionarse de 4 y 6.

5 En algunas realizaciones cuando Y es A3 o Y^L es B3, n puede ser 4.

En algunas realizaciones cuando Y es A4 o Y^L es B4, n puede ser 4.

En algunas realizaciones cuando Y es A5 o Y^L es B5, n puede ser 11.

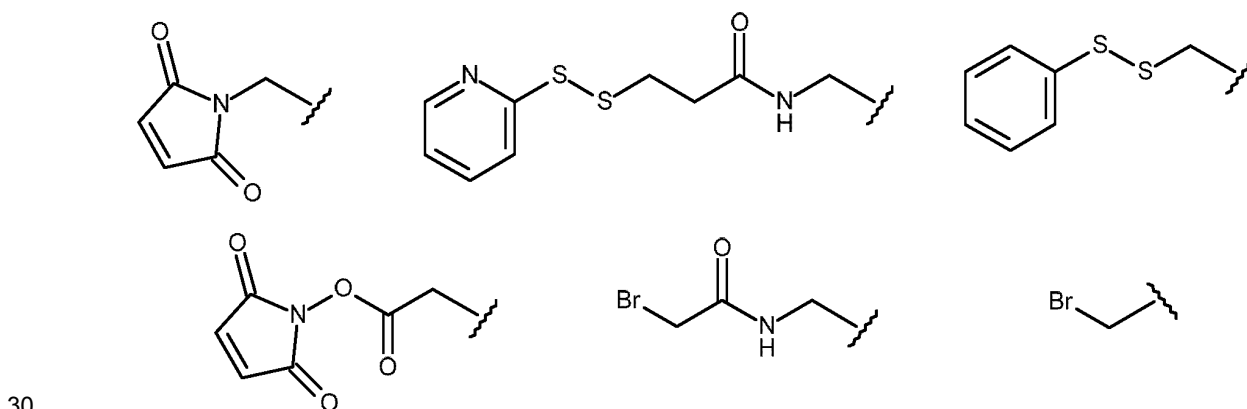
10

En algunas realizaciones cuando Y es A6 o Y^L es B6, n puede ser 2.

L y G

15 L es un enlazador conectado al agente de unión celular en el compuesto conjugado. G es un grupo reactivo para conectar el dímero de PBD al agente de unión celular para formar el compuesto conjugado.

Preferentemente, el enlazador/grupo reactivo contiene un grupo funcional electrófilo para que reaccione con un grupo funcional nucleófilo en el agente de unión celular. Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) grupos maleimida (ii) disulfuros activados, (iii) ésteres activos tales como ésteres de NHS (N-hidroxisuccinimida), ésteres de HOBt (N-hidroxibenzotriazol), haloformiatos y haluros ácidos; (iv) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas y (v) aldehídos, cetonas, carboxilo y algunos de los cuales se ejemplifican como sigue:

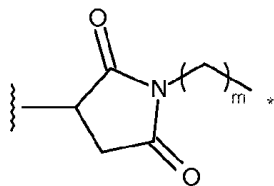


Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de enlazador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitolo). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña a manipular anticuerpos mediante introducción de aminoácidos de cisteína reactivos.

En algunas realizaciones, el enlazador tiene un grupo nucleófilo que es reactivo con un grupo electrófilo presente sobre un anticuerpo. Grupos electrófilos útiles sobre un anticuerpo incluyen grupos carbonilo de aldehído y cetona. El heteroátomo es un grupo nucleófilo de un enlazador que puede reaccionar con un grupo electrófilo sobre un anticuerpo y formar un enlace covalente con respecto a una unidad de anticuerpo. Grupos nucleófilos útiles sobre un enlazador incluyen hidrazida, oxima, amino, hidroxilo, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazina. El grupo electrófilo sobre un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

45

En una realización, el grupo L es:

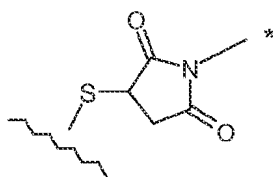


5 donde el asterisco indica el punto de unión al resto del grupo Y, la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión celular y m es un número entero seleccionado del intervalo de 0 a 6. En una realización, m se selecciona de 2, 3, 4 y 5.

En una realización, la conexión entre el agente de unión celular y L es a través de un resto tiol del agente de unión celular y un grupo maleimida de L.

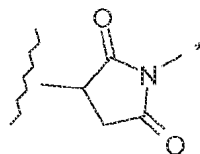
10

En una realización, la conexión entre el agente de unión celular y L es:



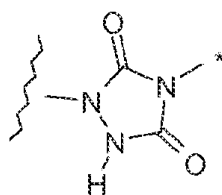
15 donde el asterisco indica el punto de unión a la porción restante del grupo L o a la porción restante del grupo Y y la línea ondulada indica el punto de unión a la porción restante del agente de unión celular. En esta realización, el átomo S habitualmente procede del agente de unión celular.

20 En cada una de las realizaciones anteriores, puede usarse una funcionalidad alternativa en lugar del grupo derivado de maleimida mostrado a continuación:



25 donde la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión celular como anteriormente y el asterisco indica la unión a la porción restante del grupo L o a la porción restante del grupo Y.

En una realización, el grupo derivado de maleimida se sustituye con el grupo:



30 donde la línea ondulada indica el punto de unión al agente de unión celular y el asterisco indica la unión a la porción restante del grupo L o a la porción restante del grupo Y.

35 En una realización, el grupo derivado de maleimida se sustituye con un grupo, el cual opcionalmente junto con el agente de unión celular, se selecciona entre:

-C(=O)NH-,

40 -C(=O)O-,

-NHC(=O)-,

-OC(=O)-,

45 -OC(=O)O-,

-NHC(=O)O-

-OC(=O)NH-

5 -NHC(=O)NH-

-NHC(=O)NH,

10 -C(=O)NHC(=O)-,

-S-

-S-S-

15 -CH₂C(=O)-

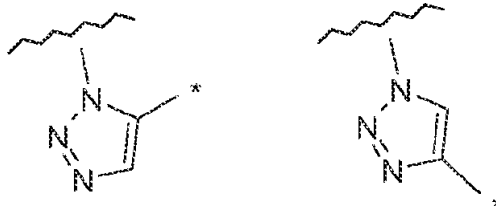
-C(=O)CH₂-

=N-NH-

20 y

-NH-N=.

25 En una realización, el grupo derivado de maleimida se sustituye con un grupo, el cual opcionalmente junto con el agente de unión celular, se selecciona entre:

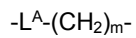


30 donde la línea ondulada indica o el punto de unión al agente de unión celular o el enlace a la porción restante del grupo L o a la porción restante del grupo Y y el asterisco indica el otro punto de unión al agente de unión celular o el enlace a la porción restante del grupo L o a la porción restante del grupo Y.

Otros grupos que pueden usarse como L para conectar la porción restante del grupo Y al agente de unión celular se describen en el documento WO 2005/082023.

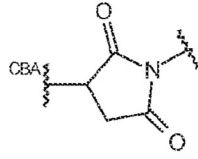
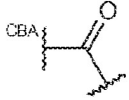
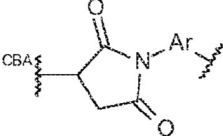
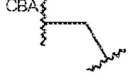
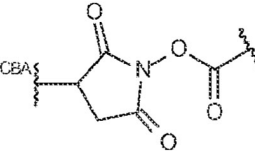
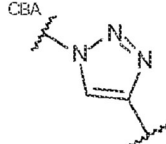
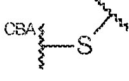
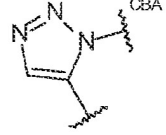
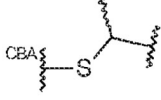
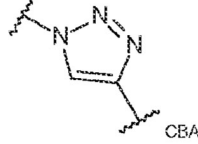
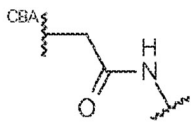
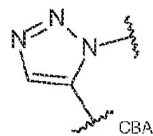
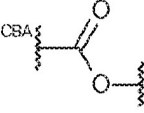
35

Por lo tanto, en las realizaciones de la presente invención, L es de fórmula:



40 donde m es de 0 a 6 y

L^A se selecciona entre:

(L ^{A1-1})		(L ^{A6})	
(L ^{A1-2})		(L ^{A7})	
(L ^{A2})		(L ^{A8-1})	
(L ^{A3-1})		(L ^{A8-2})	
(L ^{A3-2})		(L ^{A9-1})	
(L ^{A4})		(L ^{A9-2})	
(L ^{A5})			

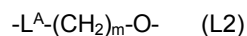
donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆, por ejemplo fenileno.

5 En algunas realizaciones donde L es L¹, m puede ser 2, 3 o 5.

En algunas realizaciones donde L es L¹, L^A puede ser L^{A1-1}.

En realizaciones de la presente invención, L es de fórmula:

10



Donde m es de 0 a 6; y

L^A se selecciona de los grupos anteriores.

15

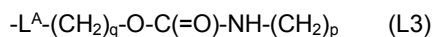
Sin desear quedar ligado a teoría alguna, un grupo tal puede escindirse del anticuerpo de tal manera que el grupo carbamato produzca una amina terminal.

En algunas realizaciones donde L es L², L^A puede ser L^{A3-2}.

20

En algunas realizaciones donde L es L², m puede ser 1.

En realizaciones de la presente invención, L es de fórmula:



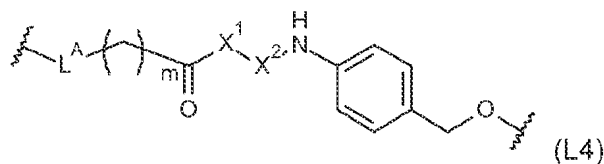
Donde q es de 1 a 3 y p es de 1 a 3; y
L^A se selecciona de los grupos anteriores.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, un grupo tal puede escindirse del anticuerpo de tal manera que el grupo carbamato produzca el grupo: H₂N-(CH₂)_p- (L3').

En algunas realizaciones donde L es L3, q puede ser 1 y p puede ser 2.

10 En algunas realizaciones donde L es L3, L^A puede seleccionarse de L^{A7}, L^{A8-1} y L^{A8-2}.

En algunas realizaciones de la presente invención, L es de fórmula:



15 Donde m es de 0 a 6;
X¹ y X² son grupos de aminoácidos, seleccionados de aminoácidos naturales, que pueden estar modificados;
L^A se selecciona de los grupos anteriores.

20 Los aminoácidos naturales pueden seleccionarse de tal manera que el grupo dipéptido sea lábil a catepsina.

En una realización, el grupo -X₁-X₂- se selecciona de:

- 25 - Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-,
30 - Phe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Ile-Cit-,
- Phe-Arg-,
- Trp-Cit-

35 donde Cit es citrulina.

Preferentemente, el grupo -X₁-X₂- se selecciona de:

- 40 - Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-

45 Lo más preferentemente, el grupo -X₁-X₂- es - Phe-Lys- o - Val-Ala-.

En algunas realizaciones donde L es L4, m puede ser 1.

50 Pueden usarse otras combinaciones de dipéptido, incluyendo aquellas descritas por Dubowchik y col., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13, 855-869.

55 En una realización, la cadena lateral de aminoácidos se derivatiza, cuando sea apropiado. Por ejemplo, un grupo amino o un grupo carboxi de una cadena lateral de aminoácidos puede derivatizarse. En una realización, un grupo amino NH₂ de una cadena lateral de aminoácidos, tales como una lisina, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en NHR y NRR'.

En una realización, un grupo carboxi COOH de una cadena lateral de aminoácidos, tales como ácido aspártico, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en COOR, CONH₂, CONHR y CONRR'.

60 En una realización, la cadena lateral de aminoácidos está químicamente protegida, cuando sea apropiado. El grupo

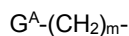
protector de cadena lateral puede ser un grupo como se analiza a continuación en relación al grupo R^L. Los presentes inventores han establecido que las secuencias de aminoácidos protegidas son escindibles por enzimas. Por ejemplo, se ha establecido que una secuencia de dipéptido que comprende un resto Lys protegido por cadena lateral Boc es escindible por catepsina.

5 Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos se conocen bien en la técnica y se describen en el Catálogo Novabiochem. Se exponen estrategias de grupos protectores adicionales en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene y Wuts.

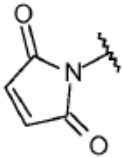
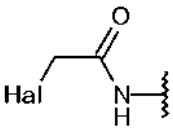
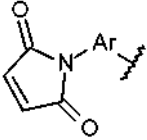
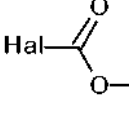
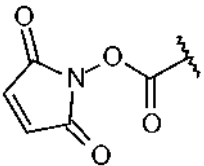
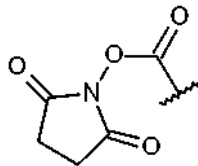
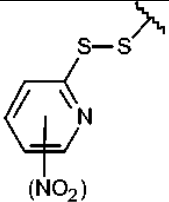
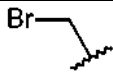
10 Se muestran a continuación posibles grupos protectores de cadena lateral para aquellos aminoácidos que tengan funcionalidad de cadena lateral reactiva:

- 15 Arg: Z, Mtr, Tos;
 Asn: Trt, Xan;
 Asp: Bzl, t-Bu;
 Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
 Glu: Bzl, t-Bu;
 Gin: Trt, Xan;
 His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
 20 Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;
 Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
 Thr: Bz;
 Trp: Boc;
 Tyr Bzl, Z, Z-Br.

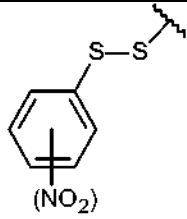

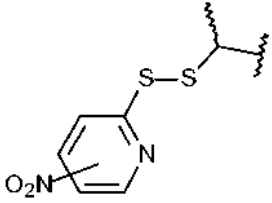

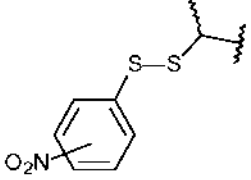
25 Por lo tanto, en las realizaciones de la presente invención, G es de fórmula:



30 Donde m es de 0 a 6; y
 G^A se selecciona entre:

(G ^{A1-1})		(G ^{A4})	 donde Hal = I, Br, Cl
(G ^{A1-2})		(G ^{A5})	
(G ^{A2})		(G ^{A6})	
(G ^{A3-1})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{A7})	

(continuación)

(G ^{A3-2})	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(G ^{A8})	
(G ^{A3-3})	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(G ^{A9})	
(G ^{A3-4})	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>		

donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆, por ejemplo fenileno.

5 En algunas realizaciones donde G es G1, m puede ser 2, 3 o 5.

En algunas realizaciones donde G es G1, G^A puede ser G^{A1-1}.

En realizaciones de la presente invención, G es de fórmula:

10



Donde m es de 0 a 6; y

G^A se selecciona de los grupos anteriores.

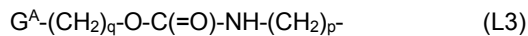
15

En algunas realizaciones donde G es G2, G^A puede ser G^{A3-2}.

En algunas realizaciones donde G es G2, m puede ser 1.

20

En realizaciones de la presente invención, G es de fórmula:



Donde q es de 1 a 3 y p es de 1 a 3; y

G^A se selecciona de los grupos anteriores.

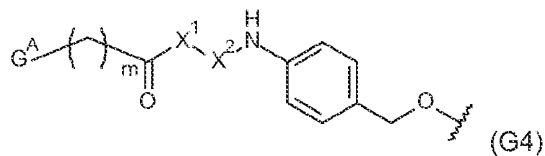
25

En algunas realizaciones donde G es G3, q puede ser 1 y p puede ser 2.

En algunas realizaciones donde G es G3, G^A puede seleccionarse de G^{A7} y G^{A8}.

30

En realizaciones de la presente invención, G es de fórmula:



Donde m es de 0 a 6;
 X^1 y X^2 son como se define anteriormente para L4;
 G^A se selecciona de los grupos anteriores.
 R^{4A}

- 5 En una realización, R^{4A} es un grupo alquileo C_{2-4} .
- En una realización, R^{4A} es un grupo alquileo C_2 .
- 10 En una realización, R^{4A} es un grupo alquileo C_3 .
- En una realización, R^{4A} es un grupo alquileo C_{1-6} no sustituido.
- En una realización, R^{4A} es un grupo alquileo C_{1-6} lineal.
- 15 En una realización, R^{4A} se selecciona del grupo que consiste en $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ y $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$.

Agente de unión a célula

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

- El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (Miller y col. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que puede reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por CDR sobre múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. Por tanto, Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo tales dianas célula cancerosa o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD y IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie, que incluye origen humano, murino o de conejo.
- 25
30
35
40

- Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 45

- La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) *Nature* 256:495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597.
- 50
55
60

- 65 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los

- que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el grupo de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos
- 5 de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo o simio superior) y secuencias de la región constante humanas.
- 10 Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende un dominio VL y VH, además de un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una
- 15 región Fc de la secuencia nativa o región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de receptores de la superficie celular tales como receptor de linfocitos B y BCR.
- 20 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse anticuerpos intactos a diferentes "clases". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Ejemplos de agentes de unión a célula incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

- 30 El agente de unión a célula puede ser, o comprender, un polipéptido. El polipéptido puede ser un polipéptido cíclico. El agente de unión a célula puede ser un anticuerpo. De esta manera, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

Carga de fármaco

- 35 La carga de fármaco es el número promedio de fármacos de PBD por anticuerpo. Si los compuestos de la invención están unidos al anticuerpo, la carga de fármaco puede oscilar de 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo (Ab), es decir, en los que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están covalentemente unidos al agente de unión a célula. Las composiciones de ADC incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 y 8. El
- 40 número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA, electroforesis y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. Por ELISA, puede determinarse el valor promedio de p en una preparación particular de ADC (Hamblett y col. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070; Sanderson y col (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852). Sin embargo, la distribución de valores de p (fármaco) no es discernible por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de ELISA. Asimismo, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina si los restos de fármaco están unidos al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o cadena ligera, o los restos de aminoácidos particulares. En algunos casos, puede lograrse la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco por medios tales como HPLC de
- 50 fase inversa o electroforesis.

- Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión sobre el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los cuales puede unirse un enlazador. Mayor carga de fármaco, por ejemplo, $p > 5$, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.
- 55

- Normalmente, menos del máximo teórico de los restos de fármaco están conjugados con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo conector. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo con amina. Asimismo, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de enlazador reactivo con tiol. En general, los anticuerpos no contienen muchos, si los hay, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a un resto de fármaco. La mayoría de los restos de tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes de disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i)
- 60
- 65

limitando el exceso molar de producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo de conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de la conjugación o temperatura, y (iii) condiciones reductoras parciales o reductoras limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

- 5 Los aminoácidos de cisteína pueden manipularse por ingeniería en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro entre cadenas o intermoleculares (Junutula, y col., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan y col. (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; documento WO2009/052249, Shen y col. (2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutula y col (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52). Los tioles de cisteína manipulados por ingeniería pueden reaccionar con reactivos de enlazador o los reactivos de fármaco-
10 enlazador de la presente invención que tienen grupos electrófilos reactivos con tiol, tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos manipulados por ingeniería por cisteína (ThioMabs) y el resto de fármacos de PBD. Así, la localización del resto de fármaco puede diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco puede controlarse, ya que los grupos tiol de cisteína manipulados por ingeniería normalmente reaccionan con reactivos de enlazador reactivos con tiol o reactivos de fármaco-enlazador en alto rendimiento. La manipulación
15 de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína por sustitución en un único sitio sobre la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas sobre el anticuerpo simétrico. Una carga de fármaco próxima a 2 puede lograrse y casi homogeneidad del producto de conjugación ADC.

- 20 Si más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un producto intermedio de fármaco-enlazador, o reactivo de enlazador seguido de resto de fármaco reactivo, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los procedimientos de cromatografía de líquidos tales como fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrófoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un único valor de carga de fármaco (p) pueden aislarse, sin embargo, estos ADC de valor de carga único
25 pueden todavía ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco pueden unirse, mediante el enlazador, en diferentes sitios sobre el anticuerpo.

- De este modo, las composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco en las que el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco de PBD y en las que los restos de fármaco pueden unirse al anticuerpo en diversos restos de aminoácidos.
30

- En una realización, En una realización, el número promedio de grupos de pirrolobenzodiazepina diméricos por agente de unión a célula está en el intervalo 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo está seleccionado de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, y 4 a 8.
35

En algunas realizaciones, hay un grupo de pirrolobenzodiazepina dimérico por agente de unión a célula.

Péptidos

- 40 En una realización, el agente de unión a célula es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-20, preferentemente 6-20, restos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión a célula esté enlazado a un compuesto de pirrolobenzodiazepina monomérico o dimérico.

- 45 En una realización, el agente de unión a célula comprende un péptido que se une a integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ con respecto a XY5.

- 50 En una realización, el agente de unión a célula comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Como alternativa, puede usarse una variante de la secuencia de A20FMDV-Cys en la que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez restos de aminoácidos están sustituidos con otro resto de aminoácido.

- 55 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo quimérico; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo completamente humano; o un anticuerpo de cadena sencilla. Una realización del anticuerpo es un fragmento de uno de estos anticuerpos teniendo actividad biológica. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv,

En estas realizaciones, cada anticuerpo puede estar enlazado a uno o varios grupos de pirrolobenzodiazepina dimérica. Las relaciones preferidas de pirrolobenzodiazepina a agente de unión a célula se dan anteriormente.

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

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

- 65 Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen aquellos anticuerpos descritos en el documento WO 2005/082023. Son particularmente preferidos aquellos anticuerpos para antígenos asociados a tumor. Algunos ejemplos de esos antígenos conocidos en la técnica incluyen aquellos antígenos asociados a tumor expuestos en el

documento WO 2005/082023. Véase, por ejemplo, las páginas 41-55.

5 Los conjugados de la invención se diseñan para marcar como diana células tumorales a través de sus antígenos de superficie celular. Los antígenos son habitualmente antígenos de superficie de células normales que se sobreexpresan o bien se expresan en tempos anormales. Idealmente el antígeno diana se expresa solamente en células proliferativas (preferentemente células tumorales), sin embargo esto raramente se observa en la práctica. Como resultado, los antígenos diana se seleccionan habitualmente en base a la expresión diferencial entre tejido proliferativo y sano.

10 Los antígenos asociados al tumor (TAA) se conocen en la técnica y pueden prepararse para su uso en la generación de anticuerpos usando métodos e información que son bien conocidos en la técnica. En intentos de descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia de cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o de otra manera asociados a tumores que se expresen específicamente en la superficie de uno o más tipos o tipos particulares de células de cáncer en comparación con una o más célula o células no cancerosas normales. A menudo, tales polipéptidos asociados a tumor se expresan más abundantemente en la superficie de las células de cáncer en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de tales polipéptidos de antígeno de superficie celular asociados a tumor ha dado lugar a la capacidad de marcar como diana específicamente células de cáncer para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

20 Algunos ejemplos de TAA incluyen TAA (1)-(36) listados a continuación. Por conveniencia, la información que se refiere a estos antígenos, todos los cuales se conocen en la técnica, se lista a continuación e incluye nombres, nombres alternativos, números de registro de Genbank y referencia o referencias primarias, siguiendo las convenciones de identificación de secuencia de ácidos nucleicos y proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas que corresponden a TAA (1)-(36) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumor marcados como diana por anticuerpos incluyen todas las variantes e isoformas de secuencias de aminoácidos que poseen al menos aproximadamente un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas o que exhiben sustancialmente las mismas propiedades biológicas o características que un TAA que tiene una secuencia encontrada en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una secuencia variante generalmente es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia correspondiente listada.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR (1)-(36):

35 (1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB, N.º de registro de Genbank NM_001203) ten Dijke, P., y col. *Science* 264 (5155): 101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997)); documento WO2004/063362 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/134790-A1 (Página 38-39); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 296); documento WO2003/055443 (Página 91-92); documento WO2002/99122 (Ejemplo 2; Página 528-530); documento WO2003/029421 (Reivindicación 6); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Figura 112); documento WO2002/98358 (Reivindicación 1; Página 183); documento WO2002/54940 (Página 100-101); documento WO2002/59377 (Página 349-350); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 376); documento WO2001/48204 (Ejemplo; Figura 4); NP_001194 receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB/pid=NP_001194.1. Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994

45 (2) E16 (I.AT1, SLC7A5, N.º de registro de Genbank NM_003486) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., y col (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16): 11267-11273; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/99074 (Reivindicación 19; Página 127-129); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393); documento WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 293); documento WO2002/64798 (Reivindicación 33; Página 93-95); documento WO2000/14228 (Reivindicación 5; Página 133-136); documento US2003/224454 (Figura 3); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 150); NP_003477 familia 7 de vehículo soluto (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid=NP_003477.3 - *Homo sapiens*; Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

60 (3) STEAP1 (antígeno epitelial transmembrana seis de próstata, N.º de registro de Genbank NM_012449); *Cancer Res.* 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., y col (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528; documento WO2004/065577 (Reivindicación 6); documento WO2004/027049 (Figura 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); US2003/157089 (Ejemplo 5); US2003/185830 (Ejemplo 5); US2003/064397 (Figura 2); documento WO2002/89747 (Ejemplo 5; Página 618-619); documento WO2003/022995 (Ejemplo 9; Figura 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Figura 2A); NP_036581 antígeno epitelial transmembrana seis de la próstata; Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

65

- (4) 0772P (CA125, MUC16, N.º de registro de Genbank AF361486); *J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375 (2001); documento WO2004/045553 (Reivindicación 14); documento WO2002/92836 (Reivindicación 6; Figura 12); documento WO20G2/83866 (Reivindicación 15; Página 116-121); US2003/124140 (Ejemplo 16); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1
- 5
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocito, mesotelina, N.º de registro de Genbank NM_005823) Yamaguchi. N., y col. *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20): 11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1): 136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995); documento WO2003/101283 (Reivindicación 14); (documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 287-288); documento WO2002/101075 (Reivindicación 4; Página 308-309); documento WO2002/71928 (Página 320-321); documento WO94/10312 (Página 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1
- 10
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NaPi2B, NPTIIb, SLC34A2, familia 34 de vehículo soluto (fosfato sódico), transportador 3b de fosfato dependiente de sodio, miembro 2, tipo II, N.º de registro de Genbank NM_006424) *J. Biol. Chem.* 277 (22): 19665-19672 (2002), *Genomics* 62 (2):281-284 (1999), Felid, J.A., y col (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578- 582); documento WO2004/022778 (Reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 326); documento EP0875569 (Reivindicación 1; Página 17-19); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20; Página 329); documento WO2004/032842 (Ejemplo IV); documento WO2001/75177 (Reivindicación 24; Página 139-140); Referencias cruzadas: MiM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1.
- 15
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto (semaforina) 5B, N.º de registro de Genbank AB040878); Nagase T., y col (2000) *DNA Res.* 7 (2): 143-150); documento WO2004/000997 (Reivindicación 1); documento WO2003/003984 (Reivindicación 1); documento WO2002/06339 (Reivindicación 1; Página 50); documento WO2001/88133 (Reivindicación 1; Página 41-43, 48-58); documento WO2003/054152 (Reivindicación 20); documento WO2003/101400 (Reivindicación 11); Registro: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737
- 20
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 270G050C12, gen RIKEN ADNc 2700050C12, N.º de registro de Genbank AY358628); Ross y col. (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553; documento US2003/129192 (Reivindicación 2); documento US2004/044180 (Reivindicación 12); documento US2004/044179 (Reivindicación 11); documento US2003/096961 (Reivindicación 11); documento US2003/232056 (Ejemplo 5); documento WO2003/105758 5 (Reivindicación 12); documento US2003/206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); documento WO2003/025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAG88991.1; AY358628_1
- 25
- (9) ETBR (receptor de tipo B de Endotelina. N.º de registro de Genbank AY275463); Nakamuta M., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., y col *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., y col. *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., y col. *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., y col. *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., y col. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M, y col. *Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., y col. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., y col *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., y col. *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., y col *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., y col *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., y col I, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., y col *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., y col *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., y col *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., y col *Hum. Genet* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., y col *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., y col (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; documento WO2004/045518 (Reivindicación 1); WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/040000 (Reivindicación 151); documento WO2003/087768 (Reivindicación 1); documento WO2003/018475 (Reivindicación 1); WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/61087 (Figura 1); documento WO2003/018494 (Figura 6); documento WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 144); documento WO2001/98351 (Reivindicación 1; Página 124-125); documento EP0522868 (Reivindicación 8; Figura 2); documento WO2001/77172 (Reivindicación 1; Página 297-299); documento US2003/109676; documento US6518404 (Figura 3); documento US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); documento WO2004/001004
- 30
- (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N.º de registro de Genbank NM_017763); documento WO2003/104275 (Reivindicación 1); documento WO2004/046342 (Ejemplo 2); WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2003/083074 (Reivindicación 14; Página 61); documento WO2003/018621 (Reivindicación 1); WO2003/024392 (Reivindicación 2; Figura 93); documento WO2001/66689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1
- 35
- (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado a cáncer de próstata, proteína 1 asociada a cáncer de próstata, antígeno epitelial seis transmembrana de próstata 2, proteína
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- de próstata seis transmembrana, N.º de registro de Genbank AF455138); Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); documento WO2003/087306; documento US2003/064397 (Reivindicación 1; Figura 1); documento WO2002/72596 (Reivindicación 13; Página 54-55); documento WO2001/72962 (Reivindicación 1; Figura 4B); documento WO2003/104270 (Reivindicación 11); documento WO2003/104270 (Reivindicación 16); documento US2004/005598 (Reivindicación 22); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento US2003/060612 (Reivindicación 12; Figura 10); documento WO2002/26822 (Reivindicación 23; Figura 2); documento WO2002/16429 (Reivindicación 12; Figura 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1
- 5
- 10 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4, N.º de referencia de Genbank NM_017636); Xu, X.Z., y col *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003)); documento US2003/143557 (Reivindicación 4): WO2000/40614 (Reivindicación 14; Página 100-103); WO2002/10382 (Reivindicación 1; Figura 9A); documento WO2003/042661 (Reivindicación 12); documento WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 391); documento US2003/219806 (Reivindicación 4); documento WO2001/62794 (Reivindicación 14; Figura 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_080106.2; NM_017636_1
- 15
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma, N.º de registro de Genbank NP_003203 o NM_003212); Ciccodicola, A., y col *EMBO J.* 8 (7): 1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555-585 (1991)); documento US2003/224411 (Reivindicación 1); documento WO2003/083041 (Ejemplo 1); documento WO2003/034984 (Reivindicación 12); documento WO2002/88170 (Reivindicación 2; Página 52-53); documento WO2003/024392 (Reivindicación 2; Figura 58); documento WO2002/16413 (Reivindicación 1; Página 94-95, 105); documento WO2002/22808 (Reivindicación 2; Figura 1); documento US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); documento US5792616 (Figura 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1
- 20
- 25 (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs.73792 N.º de registro de Genbank M28004); Fujisaku y col (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., y col *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., y col *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., y col *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., y col *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., y col (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento U82004/005538 (Ejemplo 1); documento WO2003/062401 (Reivindicación 9); documento WO2004/045520 (Ejemplo 4); documento WO91/02536 (Figura 9.1-9.9); WG2004/020595 (Reivindicación 1); registro: P20023; G13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.
- 30
- 35 (15) CD79b (CD79B, CD79p, Igb (beta asociado a inmunoglobulina), B29, N.º de registro de Genbank NM_000626 o 11038674); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller y col (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6): 1621-1625); documento WO2004/016225 (reivindicación 2, Figura 140); documento WO2003/087768, documento US2004/101874 (reivindicación 1, página 102); documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento US2002/150573 (reivindicación 5, página 15); documento US5644033; documento WO2003/048202 (reivindicación 1 páginas 306 y 309); documento WO 99/58658, US6534482 (reivindicación 13, Figura 17A/B); documento WO2000/55351 (reivindicación 11 páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1
- 40
- 45 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene un dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N.º de registro de Genbank NM_030764, AY358130); *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., y col. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; documento WO2004/016225 (Reivindicación 2); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (Reivindicación 5; Figura 18D-1-18D-2); documento WO2003/097803 (Reivindicación 12); documento WO2003/089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1
- 50
- 55 (17) HER2 (ErbB2, N.º de registro de Genbank M11730); Coussens L., y col *Science* (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., y col *Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., y col. *J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., y col. *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., y col. *Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., y col. (1993) *Genomics* 15, 426-429; documento WO2004/048938 (Ejemplo 2); documento WO2004/027049 (Figura 11); documento WO2004/009622; documento WO2003/081210; documento WO2003/089904 (Reivindicación 9); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento US2003/118592; documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); documento WO2003/055439 (Reivindicación 29; Figura 1A-B); documento WO2003/025228 (Reivindicación 37; Figura 5C); documento WO2002/22636 (Ejemplo 13; Página 95-107); documento WO2002/12341 (Reivindicación 68; Figura 7); documento WO2002/13847 (Página 71-74); documento WO2002/14503 (Página 114-117); documento WO2001/53463 (Reivindicación 2; Página 41-46); documento WO2001/41787 (Página 15); documento WO2000/44899 (Reivindicación 52; Figura 7); documento WO2000/20579 (Reivindicación 3; Figura 2); documento US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); documento WO9630514 (Reivindicación 2; Página 56-61); documento EP1439393 (Reivindicación 7); documento WO2004/043361 (Reivindicación 7); documento
- 60
- 65

WO2004/022709; documento WO2001/00244 (Ejemplo 3; Figura 4); Registro: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1. En ciertas realizaciones, los compuestos conjugados de la invención comprenden anticuerpos anti-HER2. En una realización de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-HER2 humanizado, por ejemplo, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8, como se describe en la Tabla 3 del documento US 5821337. Estos anticuerpos contienen regiones marco humanas con las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. El anticuerpo humanizado huMAb4D5-8 también se denomina trastuzumab, disponible en el mercado bajo el nombre comercial HERCEPTIN. En otra realización de la invención, un anticuerpo anti-HER2 de un ADC de la invención comprende un anticuerpo anti-HER2, por ejemplo, 2C4 humanizado, como se describe en el documento US7882817. Un anticuerpo 2C4 humanizado a modo de ejemplo es pertuzumab, disponible en el mercado bajo el nombre comercial PERJETA.

(18) NCA (CEACAM6, N.º de registro de Genbank M18728); Barnett T., y col. *Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., y col. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 2002; documento WO2004/063709; documento EP1439393 (reivindicación 7); documento WO2004/044178 (Ejemplo 4); documento WO2004/031238; documento WO2003/042661 (reivindicación 12); documento WO2002/78524 (Ejemplo 2); documento WO2002/86443 (Reivindicación 27; Página 427); documento WO2002/60317 (reivindicación 2); Registro: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728

(19) MDP (DPEP1, N.º de registro de Genbank BC017Q23); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (261:16899-16903 (2002)); documento WO2003/016475 (Reivindicación 1); documento WO2002/64798 (reivindicación 33; Página 85-87); JP05003790 (Figura 6-8); documento WO99/46284 (Figura 9); Referencias cruzadas: MiM:179780; AAH 17023.1; BC017023_1

(20) IL20Ra (IL20Ra, ZCYTOR7, N.º de registro de Genbank AF184971); Clark H.F., et al *20 Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungali A.J., y col. *Natura* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., y col. *Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., y col. *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J. y col. *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., y col. (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., y col (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010; Documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/005320 (Ejemplo 5); documento WO2003/029262 (Página 74-75); documento WO2003/002717 (Reivindicación 2; Página 63); documento WO2002/22153 (Página 45-47); documento US2002/042366 (Página 20-21); documento WO2001/46261 (Página 57-59); documento WO2001/46232 (Página 63-65); documento WO98/37193 (reivindicación 1; Página 55-59); Registro: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N.º de registro de Genbank AF229053); Gary S.C., y col. *Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H.F., y col. *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; documento US2003/186372 (reivindicación 11); documento US20Q3/186373 (Reivindicación 11); documento US2003/119131 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119122 (Reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119126 (Reivindicación 1); documento US2003/119121 (Reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119129 (Reivindicación 1); documento US2003/119130 (Reivindicación 1); documento US2003/119128 (reivindicación 1; Figura 52); documento US2003/119125 35 (reivindicación 1); documento WO2003/016475 (reivindicación 1); documento WO2002/02634 (Reivindicación 1)

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N.º de registro Genbank NM_0004442); Chan J. y Watt, V.M., *Oncogene* 8 (6), 1057-1081 (1991) *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000)); documento WO2003042661 (reivindicación 12); documento WO200053216 (reivindicación 1; Página41); documento WO2004065576 (Reivindicación 1); documento WO2004020583 (Reivindicación 9); documento WO2003004529 (Página 128-132); documento WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h, N.º de registro de Genbank AX092328); documento US2004/0101899 (Reivindicación 2); documento WO2003104399 (Reivindicación 11); WO2004000221 (Figura 3); documento US2003/165504 (Reivindicación 1); documento US2003/124140 (Ejemplo 2); documento US2003/065143 (Figura 80); documento WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 299); documento US2003/091580 (Ejemplo 2); documento WO2002/10187 (Reivindicación 6; Figura 10); documento WO2001/94641 (Reivindicación 12; Figura 7b); documento WO2002/02624 (Reivindicación 13; Figura 1A-1B); documento US2002/034749 (Reivindicación 54; Página 45-46); WO2002/06317 (Ejemplo 2; Página 320-321, Reivindicación 34; Página 321-322); documento WO2002/71928 (Página 468-469); documento WO2002/02587 (Ejemplo 1; Figura 1); documento WO2001/40269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); documento WO2000/36107 (Ejemplo 2; Página 205-207); documento WO2004/053079 (Reivindicación 12); documento WO2003/004989 (Reivindicación 1); documento WO2002/71928 (Página 233-234, 452-453); documento WO 01/16318

(24) PSCA (precursor de antígenos de células madre de próstata, N.º de registro de Genbank AJ297436); Reiter

- R.E., y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., y col. *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; documento WO2004/022709; documento EP1394274 (Ejemplo 11); documento US2004/018553 (reivindicación 17); documento WO2003/008537 (Reivindicación 1); WO2002/81646 (reivindicación 1; Página 164); documento WO2003/003906 (reivindicación 10; Página 288); documento WO2001/40309 (Ejemplo 1; Figura 17); documento US2001/055751 (Ejemplo 1; Figura 1b); documento WO2000/32752 (Reivindicación 18; Figura 1); documento WO98/51805 (reivindicación 17; Página 97); documento WO98/51824 (Reivindicación 10; Página 94); documento WO98/40403 (Reivindicación 2; Figura 1B); Registro: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1
- 5
- 10 (25) GEDA (N.º de registro de Genbank AY260763); AAP14954 proteína de tipo compañero de fusión de lipoma HMGC/pid=AAP14954.1 - *Homo sapiens* (humano); documento WO2003/054152 (reivindicación 20); documento WO2003/000842 (Reivindicación 1); documento WO2003/023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); documento US2003/194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: G1:30102449; AAP14954.1; AY26Q783_1
- 15 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLyS 3, BR3, N.º de registro de Genbank AF116456); receptor BAFF/pid=NP_443177.1 - *Homo sapiens*: Thompson, J.S., y col. *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); documento WO2004/058309; documento WO2004/011611; documento WO2003/045422 (Ejemplo; Página 32-33); documento WO2003/014294 (reivindicación 35; Figura 6B); documento WO2003/035846 (Reivindicación 70; Página 615-618); documento WO2002/94852 (Col 136-137); documento WO2002/38768 (Reivindicación 3; Página 133); documento WO2002/24909 (Ejemplo 3; Figura 3); Referencias cruzadas: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600
- 20
- 25 (27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de células B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SiGLEC-2, FLJ22814, N.º de referencia de Genbank AK026467); Wilson y col (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-148; documento WO2003/072036 (Reivindicación 1; Figura 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.
- (28) CD79a (GD79A, CD79 α , alfa asociado a inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo en la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de células B), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma génico: 19q13.2, N.º de referencia de Genbank NP_001774.10); documento WO2003/088808, documento US2003/0228319; documento WO2003/062401 (reivindicación 9); documento US2002/150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); documento WO99/58658 (reivindicación 13, Figura 16); documento WO92/07574 (Figura 1); documento US5644033; Ha y col (1992) *J. Immunol.* 148(5):1526-1531; Müller y col (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1621-1625; Hashimoto y col. (1994) *Immunogenetics* 40(4): 287-295; Preud'homme y col. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146; Yu y col. (1992) *J. Immunol.* 148(2):633-637; Sakaguchi y col. (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464
- 30
- 35 (29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y defensa humoral, juega un papel en la infección del VIH-2 y puede que en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma génico: 11q23.3, N.º de registro de Genbank NP_001707.1); documento WO2004/040000; WO2004/015426; documento US2003/105292 (Ejemplo 2); documento US6555339 (Ejemplo 2); documento WO2002/61087 (Figura 1); documento WO2001/57188 (Reivindicación 20, página 269); documento WO2001/72830 (páginas 12-13); documento WO2000/22129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); documento WO99/28468 (reivindicación 1, página 38); documento US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); documento WO94/28931 (páginas 56-58); documento WO92/17497 (reivindicación 7, Figura 5); Dobner y col. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella y col. (1995) *Biochem. J.* 309:773-779
- 40
- 45 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de molécula de MHC de Clase II (antígeno (Ia) que se une a péptidos y los presenta a los linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma génico: 6p21.3, N.º de referencia de Genbank NP_G02111.1); Tonnel y col. (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847; Jonsson y col. (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413; Beck y col. (1992) *J. Mol. Biol.* 228:433-441; Strausberg y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903; Servenius y col. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8768; Beck y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 255:1-13; Naruse y col. (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519; documento WO99/58658 (reivindicación 13, Figura 15); documento US6153408 (Col 35-38); documento US5976551 (col 168-170); documento US6011146 (col 145-146); Kasahara y col. (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68; Larhammar y col. (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26): 14111-14119
- 50
- 55 (31) P2X5 (canal iónico 5 activado por ligando del receptor purinérgico P2X, un canal iónico activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 17p13.3, N.º de registro de Genbank NP_002552.2); Le y col. (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199; documento WO2004/047749; documento WO2003/072035 (reivindicación 10); Touchman y col. (2000) *Genome Res.* 10:165-173; documento WO2002/22660 (reivindicación 20); documento WO2003/093444 (reivindicación 1); documento WO2003/087768 (reivindicación 1); documento WO2003/029277 (página 82)
- 60
- 65

- 5 (32) CD72 (antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 [P] Cromosoma génico: 9p13.3, N.º de registro de Genbank NP_001773.1); documento WO2004042346 (reivindicación 65); documento WO2003/026493 (páginas 51-52, 57-58); documento WO2000/75655 (páginas 105-106); Von Hoegen y col. (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903.
- 10 (33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y la apoptosis de células B, la pérdida de función se asocia a actividad de la enfermedad aumentada en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 5q12, N.º de registro de Genbank NP_005573.1); documento US2002/193567; documento WO97/07198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura et al (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura et al (1998) *Blood* 92:2815-2822; documento WO2003/083047; documento WO97/44452 (reivindicación 8, páginas 57-61); documento WO2000/12130 (páginas 24-26)
- 15 (34) FcRHI (proteína 1 tipo receptor Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios tipo Ig tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pl: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21-1q22, N.º de registro de Genbank NP_443170.1); documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 6, Figura 18E-1-18-E-2); Davis y col. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(17):9772-9777; documento WO2003/089624 (reivindicación 8); documento EP1347046 (reivindicación 1); documento WO2003/089624 (reivindicación 7)
- 20 (35) IRTA2 (receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado a traslocación 2, un inmunorreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de células B y la linfomagénesis); 977 aa, pl: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P] Cromosoma génico: 1q21, N.º de registro de Genbank Humano: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; documento WO2003/024392 (reivindicación 2, Figura 97); Nakayama y col. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127; documento WO2003/077836; documento WO2001/38490 (reivindicación 3, Figura 18B-1-18B-2)
- 25 (36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia de EGF/heredulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Registro de NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, Sec. de Ref. NCBI: NP_057276; Gen NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; N.º de registro de Genbank AF179274; AY3589Q7, CAF85723, CQ782436; documento WO2004/074320; documento JP2004113151; documento WO2003/042661; documento WO2003/009814; documento EP1295944 (páginas 69-70); documento WO2002/30268 (página 329); documento WO2001/90304; documento US2004/249130; documento US2004/022727; documento WO2004/063355; documento US2004/197325; documento US2003/232350; documento US2004/005563; documento US2003/124579; Horie y col. (2000) *Genomics* 67:146-152; Uchida y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; Liang y col. (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12; Glynne-Jones y col. (2001) *Int J Cancer.* 15 oct; 94(2):178-84.
- 30 (37) CD33 (molécula CD33, SIGLEC-3, SIGLEC3, p67; antígeno CD33 (gp67); gp67; antígeno CD33 de superficie de células mieloides; lectina 3 tipo Ig de unión a ácido siálico, lectina tipo IgG de unión a ácido siálico); Nucleótido: N.º de registro de Genbank M_23197; n.º de versión de Genbank NM_23197.1 GI:180097; fecha de actualización de grabación de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM; Polipéptido: N.º de registro de Genbank AAA51948; n.º de versión de Genbank AAA51948.1 GI:188098; fecha de actualización de grabación de Genbank: 23 Jun, 2010 08:47 AM; Simmons D., y col. *J. Immunol.* 141 (8), 2797-2800 (1988); Anticuerpos: H195 (Lintuzumab)- Raza A., y col. *Leuk Lymphoma.* Ago 2009;50(8): 1336-44; documento US6.759.045 (Seattle Genetics/Immunomedics); mAb OKT9: Sutherland, D.R. y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(7): 4515-4519 1981, Schneider.C., y col. *J Biol. Chem* 257, 8516-8522 (1982); mAb E6: Hoogenboom.H.R., y col *J Immunol* 144, 3211-3217 (1990); documento US6.590.088 (Human Genome Sciences)- por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 2 y N.º de registro de ATCC 97521; US7.557.189 (Immunogen) -por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3 y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4-6.
- 35 (38) LGR5/GPR49; Nucleótido: N.º de registro de Genbank NM_003667; n.º de versión de Genbank NM_003667.2 GI:24475886; fecha de actualización de grabación de Genbank: 22 Jul, 2012 03:38 PM; Polipéptido: N.º de registro de Genbank NP_003658; n.º de versión de Genbank NP_003658.1 GI:4504379; fecha de actualización de grabación de Genbank: 22 Jul, 2012 03:38 PM.
- 40 El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptido de unión a albúmina (ABP) (Dennis y col. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias ABP enseñadas por: (i) Dennis y col. (2002) *J Biol. Chem.* 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

En una realización, el anticuerpo se ha elevado a una diana específica, el antígeno relacionado con el tumor $\alpha_5\beta_6$.

5 El agente de unión a célula puede estar marcado, por ejemplo para ayudar a la detección o la purificación del agente bien antes de la incorporación como un conjugado, o como parte del conjugado. La marca puede ser una marca de biotina. En otra realización, el agente de unión a células puede marcarse con un radioisótopo.

Sustituyentes

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

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

20 En una realización preferida, los sustituyentes descritos en el presente documento (que incluyen los sustituyentes opcionales) se limitan a aquellos grupos que no son reactivos a un agente de unión celular. El enlace al agente de unión celular en el presente caso se forma a partir del puente entre los dos restos de PBD a través de un grupo enlazador al agente de unión celular. Los grupos funcionales reactivos localizados en otras partes de la estructura de PBD pueden ser capaces de formar enlaces adicionales al agente de unión celular (esto puede denominarse reticulación). Estos enlaces adicionales pueden alterar el transporte y la actividad biológica del conjugado. Por lo tanto, en alguna realización, los sustituyentes adicionales se limitan a aquellos que carecen de funcionalidad reactiva.

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

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

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

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

Cualquiera de las realizaciones anteriormente mencionadas puede aplicarse a cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento. Como alternativa, los sustituyentes pueden seleccionarse entre uno o más de los grupos enumerados a continuación.

40 A continuación se describen con más detalle ejemplos de sustituyentes.

45 Alquilo C₁₋₁₂: El término "alquilo C₁₋₁₂", 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, el cual puede ser alifático o alicíclico y puede estar saturado o insaturado (p. ej., parcialmente insaturado, completamente insaturado). Por lo tanto, el término "alquilo" incluye las subclases alquenilo, alquínilo, cicloalquilo, etc., tratadas a continuación.

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

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

55 Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C₃), iso-butilo (C₄), *sec*-butilo (C₄), *terc*-butilo (C₄), iso-pentilo (C₅) y neo-pentilo (C₅).

60 Un grupo alquilo opcionalmente puede interrumpirse mediante uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N(H) y S. Dichos grupos pueden denominarse "heteroalquilo".

65 Heteroalquilo C₂₋₁₂: El término "heteroalquilo C₂₋₁₂", 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 2 a 12 átomos de carbono y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N(H) y S, preferentemente O y S.

Los ejemplos de grupos heteroalquilo incluyen aquellos que comprenden una o más unidades de etilenglicol del tipo

-(OCH₂CH₂)-. El terminal de un grupo heteroalquilo puede estar en la forma primaria de un heteroátomo, por ejemplo -OH, -SH o -NH₂. En una realización preferida, el terminal es -CH₃.

5 Alqueno C₂₋₁₂: El término "alqueno C₂₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alqueno insaturados incluyen etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 1-propenilo (-CH=CH-CH₃), 2-propenilo (alilo, -CH-CH=CH₂), isopropenilo (1-metilvinilo, -C(CH₃)=CH₂), butenilo (C₄), pentenilo (C₅) y hexenilo (C₆).

10 Alquino C₂₋₁₂: El término "alquino C₂₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alquino insaturados incluyen etinilo (-C≡CH) y 2-propinilo (propargilo, -CH₂-C≡CH).

15 Cicloalquilo C₃₋₁₂: El término "cicloalquilo C₃₋₁₂", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que es también un grupo ciclico; es decir, un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo alicíclico de un compuesto de hidrocarburo cíclico (carbocíclico), cuyo resto tiene de 3 a 7 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 7 átomos en el anillo.

20 Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen los procedentes de:

compuestos de hidrocarburos monocíclicos saturados:

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);

25 compuestos de hidrocarburo monocíclico insaturado:
ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), ciclohexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) y metilciclohexeno (C₇) y

30 compuestos de hidrocarburo policíclico saturado:
norcarano (C₇), norpinano (C₇), norbornano (C₇).

35 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 en el anillo de un compuesto heterocíclico, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, de los que de 1 a 10 son heteroátomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los que de 1 a 4 son heteroátomos en el anillo.

40 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) denotan el número de átomos en el anillo o el 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.

Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen los procedentes de:

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

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

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

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

O₃: trioxano (C₆);

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

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

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

N₂O₁: oxadiazina (C₆);

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

60 N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen los obtenidos a partir de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C₅), tales como arabinofuranas, lixofuranas, ribofuranas y xilofuranas y piranosas (C₆), tales como alopiranasas, altropiranasas, glucopiranasas, manopiranasas, gulopiranasas, idopiranasas, galactopiranasas y talopiranasas.

65

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 en el anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo.

5 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, etc.) denotan el número de átomos en el anillo o el 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.

10 Los átomos en el anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en los "grupos carboarilo". Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen los obtenidos a partir de benceno (es decir fenilo) (C₆), naftaleno (C₁₀), azuleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), naftaceno (C₁₈) y pireno (C₁₆).

15 Los ejemplos de grupos arilo que comprenden anillos condensados, siendo al menos uno de los cuales un anillo aromático, incluyen 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).

20 Como alternativa, los átomos en el anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en los "grupos heteroarilo". Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen los procedentes de:

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

O₁: furano (oxol) (C₅);

25 S₁: tiofeno (tiol) (C₅);

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

N₂O₁: oxadiazol (furazan) (C₅);

N₃O₁: oxatriazol (C₅);

N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);

30 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).

35 Los ejemplos de heteroarilo que comprenden anillos condensados incluyen: C₉ (con 2 anillos condensados) derivados 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), benzofurazan (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S);

40 C₁₀(con 2 anillos condensados) derivados 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), cinolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);

C₁₁ (con 2 anillos condensados) derivados de benzodiazepina (N₂);

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

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

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

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

55 Hidroxi: -OH.

Éter: -OR, donde R es un sustituyente de éter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado grupo alcoxi C₁₋₇, tratado a continuación), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ (también denominado grupo heterociclioxi C₃₋₂₀) o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado grupo ariloxi C₅₋₂₀), preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇.

Alcoxi: -OR, donde R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₇ incluyen -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (sec-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi) y -O(tBu) (terc-butoxi).

65 Acetal: -CH(OR¹)(OR²), donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de acetal, por ejemplo, un grupo

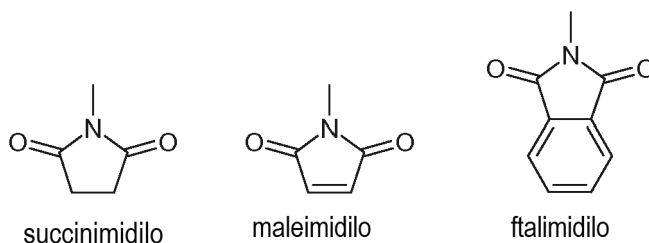
- alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R¹ y R², tomados junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los ejemplos de grupos acetal incluyen -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂ y -CH(OMe)(OEt).
- 5 Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), donde 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. Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).
- 10 Cetal: -CR(OR¹)(OR²), donde R¹ y R² son como se define para los acetales y R es un sustituyente de cetal distinto de 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. Los ejemplos de grupos cetal incluyen -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).
- 15 Hemicetal: -CR(OH)(OR¹), donde R¹ es como se define para hemiacetales y R es un sustituyente de hemicetal distinto de 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. Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen -C(Me)(OH)(OMe), -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt) y -C(Et)(OH)(OEt).
- 20 Oxo (ceto, -ona): =O.
Tiona (tiocetona): =S.
- 25 Imino (imina): =NR, donde R es un sustituyente de imina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen =NH, =NMe, =NEt y =NPh.
Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): -C(=O)H.
- 30 Acilo (ceto): -C(=O)R, donde R es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado alquilacilo C₁₋₇ o alcanilo C₁₋₇), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ (también denominado heterocicililacilo C₃₋₂₀) o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado arilacilo C₅₋₂₀), preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos acilo incluyen -C(=O)CH₃ (acetilo), -C(=O)CH₂CH₃ (propionilo), -C(=O)C(CH₃)₃ (t-butirilo) y -C(=O)Ph (benzoilo, fenona).
- 35 Carboxi (ácido carboxílico): -C(=O)OH.
Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): -C(=S)SH.
Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): -C(=O)SH.
- 40 Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): -C(=S)OH.
Ácido imídico: -C(=NH)OH.
- 45 Ácido hidroxámico: -C(=NOH)OH.
Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): -C(=O)OR, donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen -C(=O)OCH₃, -C(=O)OCH₂CH₃, -C(=O)OC(CH₃)₃ y -C(=O)OPh.
- 50 Aciloxi (éster inverso): -OC(=O)R, donde R es un sustituyente de aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos aciloxi incluyen -OC(=O)CH₃ (acetoxi), -OC(=O)CH₂CH₃, -OC(=O)C(CH₃)₃, -OC(=O)Ph y -OC(=O)CH₂Ph.
- 55 Oxicarbonilo: -OC(=O)OR, donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇.
Los ejemplos de grupos éster incluyen -OC(=O)OCH₃, -OC(=O)OCH₂CH₃, -OC(=O)OC(CH₃)₃ y -OC(=O)OPh.
- 60 Amino: -NR¹R², donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado alquilamino C₁₋₇ o di-alquilamino C₁₋₇), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente H o un grupo alquilo C₁₋₇ o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R¹ y R², 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 (-NH₂), secundarios (-NHR¹) o terciarios (-NHR¹R²) y, en forma catiónica, pueden ser cuaternarios (-⁺NR¹R²R³). Los ejemplos de grupos amino incluyen -NH₂, -NHCH₃, -NHC(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂ y -NPh. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino,
- 65

piperazino, morfolino y tiomorfolino.

Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-C(=O)NR^1R^2$, donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$ y $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, así como grupos amido en los que R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidincarbonilo, morfolincarbonilo, tiomorfolincarbonilo y piperazincarbonilo.

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

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

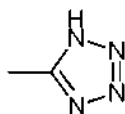


Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ y $-OC(=O)NEt_2$.

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

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

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



Imino: $=NR$, donde R es un sustituyente de imina, 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} . Los ejemplos de grupos imino incluyen $=NH$, $=NMe$ y $=NEt$.

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

Nitro: $-NO_2$.

Nitroso: $-NO$.

Azido: $-N_3$.

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

Isociano: -NC.

Cianato: -OCN.

5 Isocianato: -NCO.

Tiociano (tiocianato): -SCN.

10 Isotiociano (isotiocianato): -NCS.

Sulfhidrilo (tiol, mercapto): -SH.

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

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

Sulfina (sulfinito, sulfóxido): -S(=O)R, donde R es un sustituyente de sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfina incluyen -S(=O)CH₃ y -S(=O)CH₂CH₃.

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

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

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

40 Sulfinato (éster de ácido sulfínico): -S(=O)OR; donde R es un sustituyente de sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfinato incluyen -S(=O)OCH₃ (metoxisulfinito; sulfinato de metilo) y -S(=O)OCH₂CH₃ (etoxisulfinito; sulfinato de etilo).

45 Sulfonato (éster de ácido sulfónico): -S(=O)₂OR, donde R es un sustituyente de sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfonato incluyen -S(=O)₂OCH₃ (metoxisulfonilo; sulfonato de metilo) y -S(=O)₂OCH₂CH₃ (etoxisulfonilo; sulfonato de etilo).

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

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

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

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

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

Sulfamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos sulfamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$.

5 Sulfonamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino y R es un sustituyente de sulfonamino, 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} . Los ejemplos de grupos sulfonamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.

10 Sulfinamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino y R es un sustituyente sulfinamino, 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} . Los ejemplos de grupos sulfinamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.

15 Fosfino (fosfina): $-\text{PR}_2$, donde R es un sustituyente de fosfino, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfino incluyen $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$ y $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

Fosfo: $-\text{P}(=\text{O})_2$.

20 Fosfinilo (óxido de fosfina): $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$, donde R es un sustituyente de fosfinilo, 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} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfinilo incluyen $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$.

25 Ácido fosfónico (fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

Fosfonato (éster de fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, donde R es un sustituyente de fosfonato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfonato incluyen $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.

30 Ácido fosfórico (fosfonoxi): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

35 Fosfato (éster de fosfonoxi): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, donde R es un sustituyente de fosfato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfato incluyen $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ y $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.

Ácido fosforoso: $-\text{OP}(\text{OH})_2$.

40 Fosfito: $-\text{OP}(\text{OR})_2$, donde R es un sustituyente de fosfito, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfito incluyen $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{O-t-Bu})_2$ y $-\text{OP}(\text{OPh})_2$.

45 Fosforamidita: $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidita, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosforamidita incluyen $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ y $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

50 Fosforamidato: $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosforamidato incluyen $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ y $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

Alquileno

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

65 Los ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} lineales saturados incluyen $-(\text{CH}_2)_n-$ donde n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (propileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (butileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (pentileno) y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (heptileno).

Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ ramificados saturados incluyen -CH(CH₃)CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH(CH₂CH₃)CH₂- y -CH₂CH(CH₂CH₃)CH₂-.

- 5 Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ lineales parcialmente insaturados (alquilenilo C₃₋₁₂ y grupos alquilenilo) incluyen -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH- y -CH₂-C≡C-CH₂-.

- 10 Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ ramificados parcialmente insaturados (alquilenilo C₃₋₁₂ y grupos alquilenilo) incluyen -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- y -C≡C-CH(CH₃)-.

Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ alicíclicos saturados (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen ciclopentileno (p. ej., ciclopent-1,3-ileno) y ciclohexileno (p. ej., ciclohex-1,4-ileno).

- 15 Los ejemplos de grupos alquileo C₃₋₁₂ alicíclicos parcialmente insaturados (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen ciclopentenileno (p. ej., 4-ciclopenten-1,3-ileno), ciclohexenileno (p. ej., 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

Otras formas incluidas

- 20 Salvo que se especifique otra cosa, se incluyen en lo anterior las formas iónica, sal, solvato y protegida bien conocidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia al ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (carboxilato) (-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

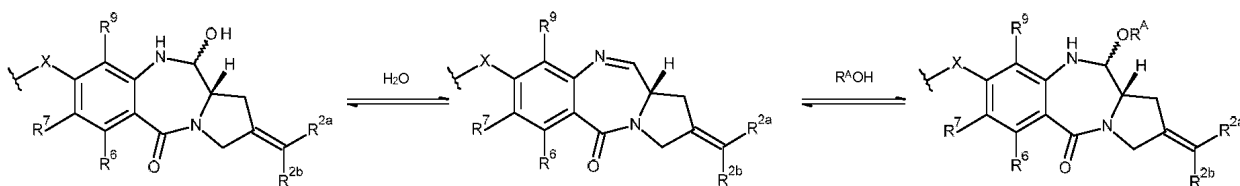
- 30 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Se tratan ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge, y col., *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19 (1977).
- 35 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (p. ej., -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen iones de metal alcalino tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺ y otros cationes tales como Al³⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen ion amonio (es decir NH₄⁺) e iones de amonio sustituidos (p. ej., NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Los 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(CH₃)₄⁺.

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

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

Solvatos

- 60 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manejar un solvato correspondiente del compuesto activo. En el presente documento el término "solvato" se usa en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo compuesto activo, sal del compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato se puede definir oportunamente como un hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.
- 65 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^AOH, donde R^A es alquilo C₁₋₄):



Estas formas pueden denominarse las formas carbinolamina y éter de carbinolamina del PBD (tal como se describe en la sección anterior en referencia a R¹⁰). 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 mismo.

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

Isómeros

Ciertos compuestos de la invención pueden existir en una o más formas geométrica, óptica, enantiomérica, diastereomérica, epimérica, atrópica, estereoisomérica, tautomérica, conformacional o anomérica, particulares incluyendo formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas barco, silla, torsión, sobre y media silla y combinaciones de las mismas, en lo sucesivo en el presente documento denominadas de forma colectiva como "isómeros" (o "formas isoméricas").

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponerse a la compañera de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que se superponen a su compañera de imagen especular.

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

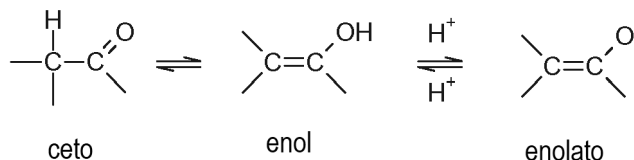
"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas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

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

Las convenciones y definiciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen generalmente a S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York y Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales y por lo tanto existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, incluyendo diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para indicar el sentido en el que el compuesto rota el plano de luz polarizada, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo por que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina a menudo una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

Cabe destacar que, excepto como se trata a continuación para formas tautoméricas, están específicamente excluidos del término "isómeros", tal como se usa en el presente documento, los isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente en la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De manera similar, una referencia al orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas estructuralmente isoméricas que pertenecen a esa clase (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n, iso, *sec* y *terc*-butilo; metoxifenilo incluye orto, meta y para-metoxifenilo).

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



5

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

10

Cabe destacar que en el término "isómero" están incluidos de forma específica los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O .

15

Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl y ^{125}I . Se incluyen diversos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C . Dichos compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios de cinética de reacción, técnicas de detección o formación de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), incluyendo ensayos de distribución de tejido de sustrato o fármaco o en el tratamiento radiactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos marcados con deuterio o sustituidos de la invención pueden tener propiedades DMPK (de metabolismo del fármaco y farmacocinéticas) mejoradas, con respecto a distribución, metabolismo y excreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio pueden proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo semivida *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado por ^{18}F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Los compuestos marcados isotópicamente de esta invención y sus profármacos generalmente pueden prepararse llevando a cabo los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritos a continuación sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible. Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo semivida *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente. La concentración de dicho isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse mediante un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de esta invención cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular está destinado a representar cualquier isótopo estable de ese átomo.

20

25

30

35

40

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

45

Actividad biológica

Ensayos de proliferación celular *in vitro*

50

En general, Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide: exponiendo las células de mamífero que tienen proteínas receptoras, por ejemplo, HER2, al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivar las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células se usan para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación por caspasas) de un ADC de la invención.

55

La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco puede medirse por un ensayo de proliferación celular. El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un procedimiento de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de luciferasa de coleópteros (patentes de EE.UU. n.º 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de

60

células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch y col. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; documento US 6602677). El CellTiter-Glo® se realiza en formato de 96 pocillos, haciéndolo susceptible a cribado de alta resolución automatizado (HTS) (Cree y col. (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (reactivo

5 CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No se requiere el lavado de células, eliminación de medio y múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir reactivo y mezclar. Las células pueden tratarse continuamente con ADC, o pueden tratarse y separarse de ADC. En general, las células tratadas brevemente, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células continuamente tratadas.

10 El formato “añadir-mezclar-medir” homogéneo produce la lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente “de tipo brillo”, producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, dependiendo del tipo de

15 célula y del medio usado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (URL). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante, con la conversión concomitante de ATP en AMP y generación de fotones.

20 La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco también puede medirse por un ensayo de citotoxicidad. Se lavan células adherentes cultivadas con PBS, se desprenden con tripsina, se diluyen en medio completo, que contiene 10 % de FCS, se centrifugan, se resuspenden en medio fresco y se cuentan con un hemocitómetro. Los cultivos en suspensión se cuentan directamente. Suspensiones monodispersas de células adecuadas para el recuento pueden requerir la agitación de la suspensión por aspiración repetida para romper los grupos de células.

25 La suspensión de células se diluye a la densidad de siembra deseada y se dispensa (100 µl por pocillo) en placas de 96 pocillos negras. Se incuban placas de líneas de células adherentes durante la noche para permitir la adherencia. Pueden usarse cultivos celulares en suspensión el día de la siembra.

30 Se prepara una solución madre (1 ml) de ADC (20 µg/ml) en el medio de cultivo celular apropiado. Se preparan diluciones de 10 veces en serie de ADC de solución madre en tubos de centrifuga de 15 ml transfiriendo en serie 100 µl a 900 µl de medio de cultivo celular.

35 Se dispensan cuatro pocillos por duplicado de cada dilución de ADC (100 µl) en placas de 96 pocillos negras, previamente sembradas con suspensión de células (100 µl), produciendo un volumen final de 200 µl. Los pocillos de control reciben medio de cultivo celular (100 µl).

Si el tiempo de duplicación de la línea celular es superior a 30 horas, la incubación de ADC es durante 5 días, si no se hace una incubación de cuatro días.

40 Al final del periodo de incubación, se evalúa la viabilidad celular con el ensayo de azul Alamar. Se dispensa azul Alamar (Invitrogen) sobre la placa completa (20 µl por pocillo) y se incuba durante 4 horas. Se mide la fluorescencia de azul Alamar a la excitación de 570 nm, emisión de 585 nm sobre el lector de placas Varioskan Flash. El porcentaje de supervivencia celular se calcula a partir de la fluorescencia media en los pocillos tratados con ADC en comparación con la fluorescencia media en los pocillos de control.

45 Eficacia *in vivo*

La eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención puede medirse por estudios de xenoinjerto de tumor en ratones. Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de un ADC anti-HER2 de la invención puede medirse por un modelo de ratón de explante transgénico de HER2 de alta expresión. Se propaga un aloinjerto del ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde a, o responde poco a, terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos se tratan una vez con ADC a ciertos niveles de dosis (mg/kg) y exposición al fármaco PBD (µg/m²); y control con tampón placebo (vehículo) y se monitorizan durante dos semanas o más para medir el tiempo hasta el duplicado del tumor, logaritmo de la destrucción celular y el encogimiento tumoral.

55 Uso

Los conjugados de la invención pueden usarse para proporcionar un compuesto de PBD en una localización diana.

60 La localización diana es preferentemente una población de células proliferativas. El anticuerpo es un anticuerpo para un antígeno presente sobre una población de células proliferativas.

65 En una realización, el antígeno está ausente o presente a un nivel reducido en una población de células no proliferativas en comparación con la cantidad de antígeno presente en la población de células proliferativas, por ejemplo, una población de células tumorales.

La localización diana puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención incluyen aquellos con utilidad para actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, covalentemente unido por un enlazador, a un resto de fármaco de PBD.

En la localización diana el enlazador puede no estar escindido. Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención pueden tener un efecto citotóxico sin escisión del enlazador para liberar un resto de fármaco de PBD. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención administran selectivamente un agente citotóxico a tejido tumoral, por lo que puede conseguirse mayor selectividad, es decir, una menor dosis eficaz.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en terapia.

En otro aspecto también se proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

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

El término "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseada, tal como, crecimiento neoplásico o hiperplásico, *in vitro* o *in vivo*.

Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen proliferación celular benigna, premaligna y maligna, incluyendo, aunque sin limitación, neoplasmas y tumores (p. ej., histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (p. ej., de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Cánceres de particular interés incluyen leucemias y cánceres de ovario.

Puede tratarse cualquier tipo de célula, incluyendo pulmón, gastrointestinal (que incluye, por ejemplo, intestino, colon), mama (mamario), ovárico, próstata, hígado (hepático), riñón (renal), vejiga, páncreas, cerebro y piel.

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

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

Se contempla que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención pueden usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizados por la expresión en exceso de un antígeno de tumor. Afecciones o trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemia, tumores malignos hematológicos y linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos, glandulares, macrófagos, epiteliales, del estroma, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, que incluyen autoinmunitarios.

En general, la enfermedad o trastorno que va a tratarse es una enfermedad hiperproliferativa tal como cáncer. Ejemplos de cáncer que van a tratarse en el presente documento incluyen carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma del pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Enfermedades autoinmunitarias para las que los compuestos de ADC pueden usarse en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus, tales como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artropatía psoriásica), artrosis, trastornos gastrointestinales y del hígado autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis

esclerosante primaria y celiacúa), vasculitis (tales como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, incluyendo la vasculitis de Churg-Strauss, la granulomatosis de Wegener y la poliarteritis), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonía-mioclónia, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias),
 5 trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y la enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, urticaria, pénfigo vulgar, pénfigo ampoloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades autoinmunitarias de la audición (tales como, por ejemplo,
 10 enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios relacionados con la diabetes tales como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Grave y tiroiditis)). Las más preferidas de tales enfermedades incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple,
 15 síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMID, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Métodos de tratamiento

Los conjugados de la presente invención se pueden usar en un método de terapia. También se proporciona un conjugado para su uso en un procedimiento de tratamiento, que comprende administrar a un sujeto que necesita
 20 tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de conjugado de la invención. 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, p ej., las decisiones sobre la dosificación, es de la responsabilidad de los facultativos
 25 generales y otros médicos.

Un compuesto de la invención 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
 30 quimioterapia (la administración de agentes activos, que incluye, por ejemplo, fármacos, tales como quimioterapéuticos); cirugía; y radioterapia.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación: agentes alquilantes,
 35 antimetabolitos, alcaloides de las plantas de venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasas, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en "terapia dirigida" y quimioterapia convencional.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS n° 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS n° 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS n° 15663-27-1), carboplatino (CAS n° 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS n° 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.
 45

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schauberg, II), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); alquilulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina,
 60
 65

melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma 1I, caliqueamicina omega 1 (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina relacionados con cromoproteína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplocina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM), que incluye, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tal como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), Pfizer, formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de 1,3-dioxolano citosina); (iv) inhibidores de proteínas cinasas tales como inhibidores de MEK (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores de la lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente, los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular anómala, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

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

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

65

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, o, es decir, un compuesto de conjugado, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, un tampón, un estabilizador farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, p. ej. cutánea, subcutánea o intravenosa.

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

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia serán muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según lo necesario.

Formulaciones

Aunque es posible usar el compuesto de conjugado (por ejemplo, administrarse) solo, frecuentemente es preferible que esté presente como una composición o formulación.

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

En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de conjugado, como se describe en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluye vehículos, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascaradores, agentes colorantes, aromatizantes y edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

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

Vehículos, diluyentes, excipientes, etc., pueden encontrarse en textos farmacéuticos estándar. Véase, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

Los procedimientos de preparación de una composición farmacéutica pueden comprender mezclar al menos un conjugado radiomarcado con [¹¹C] o compuesto similar a conjugado, como se definen en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formulan como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto activo.

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

Las formulaciones pueden prepararse por cualquier procedimiento muy conocido en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el compuesto activo con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.), y luego moldear el producto, si fuera necesario.

La formulación puede prepararse para proporcionar liberación rápida o lenta; inmediata, retardada, controlada o liberación sostenida; o una combinación de las mismas.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección), incluyen líquidos estériles, libres de pirógenos, isotónicos, acuosos o no acuosos (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el principio activo se disuelve, suspende o proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión, agentes espesantes y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor previsto. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro sódico, solución de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Normalmente, la concentración del principio activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y puede almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos.

Dosificaciones

Se apreciará por un experto en la materia que las dosificaciones apropiadas del compuesto de conjugado, y composiciones que comprenden el compuesto de conjugado, pueden variar de paciente a paciente. Determinar la dosificación óptima implicará generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico contra cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores que incluyen la actividad del compuesto particular, de la vía de administración, del tiempo de administración, la tasa de eliminación del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, el sexo, edad, peso, afección, salud general e historia médica previa del paciente. La cantidad de compuesto y la vía de administración serán por último lugar a criterio del médico, veterinario o profesional clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que consiguen el efecto deseado sin causar efectos secundarios nocivos o perjudiciales sustanciales.

La administración puede efectuarse en una dosis, continuamente o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) durante el transcurso del tratamiento. Procedimientos de determinación de los medios más eficaces y de dosificación de la administración son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y variarán con la formulación usada para la terapia, el fin de la terapia, la(s) célula(s) diana(s) que está(n) tratándose y el sujeto que está tratándose. Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples con el nivel de dosis y patrón que se selecciona por el médico práctico, veterinario o profesional clínico.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 25 mg (más normalmente aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Si el compuesto activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco, o similar, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto parental y así el peso real que va a usarse se aumenta proporcionalmente.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 mg, 3 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 150 mg, 2 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 200 mg, 2 veces al día.

Sin embargo, en una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 50 o aproximadamente 75 mg, 3 o 4 veces al día.

En una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 o aproximadamente 125 mg, 2 veces al día.

Las cantidades de dosificación descritas anteriormente pueden aplicarse al conjugado (incluyendo el resto de PBD y el conector al anticuerpo) o a la cantidad eficaz de compuesto de PBD proporcionada, por ejemplo, la cantidad de compuesto que es liberable después de la escisión del enlazador.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC de la invención dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. La molécula se administra adecuadamente al

paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación a modo de ejemplo de ADC a administrar al paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que suceda una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende un ciclo de administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de dosis adicionales cada semana, dos semanas o tres semanas de un ADC. Otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Tratamiento

El término "tratamiento", cuando se usan en el contexto del tratamiento de una afección, se refiere generalmente a tratamiento y terapia, tanto de un ser humano como un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, regresión de la afección, mejora de la afección y cura de la afección. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

De manera similar, el término "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

Los conjugados de anticuerpo-fármaco pueden prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de enlazador bivalente, para formar un Ab-L intermediario de anticuerpo-enlazador, a través de un enlace covalente, seguido por reacción con un reactivo de resto de fármaco activado; y (2) reacción de un reactivo de resto de fármaco con un reactivo enlazador, para formar un D-L reactivo de fármaco-enlazador, a través de un enlace covalente, seguido por reacción con el nucleófilo de un anticuerpo. Los procedimientos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con varios anticuerpos y enlazadores para preparar los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención.

Grupos nucleófilos sobre anticuerpos incluyen a grupos tio de cadena lateral, por ejemplo, cisteína. Los grupos tiol son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre restos de enlazador tales como aquellos de la presente invención. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de enlazador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente de disulfuro de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un animal, mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, tejón australiano), un monotremo (por ejemplo, omitorrinco), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un ave), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un simio inferior o simio superior), un simio inferior (por ejemplo, tití, babuino), un simio superior (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

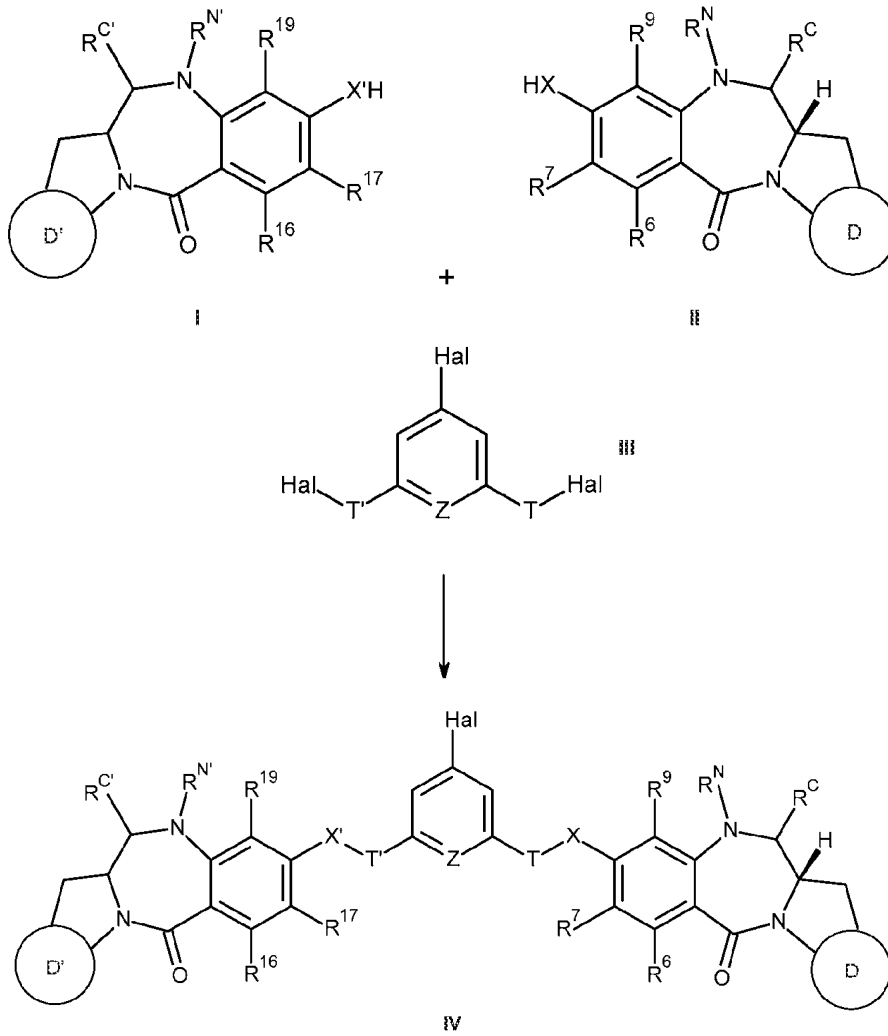
Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto. En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

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

Síntesis

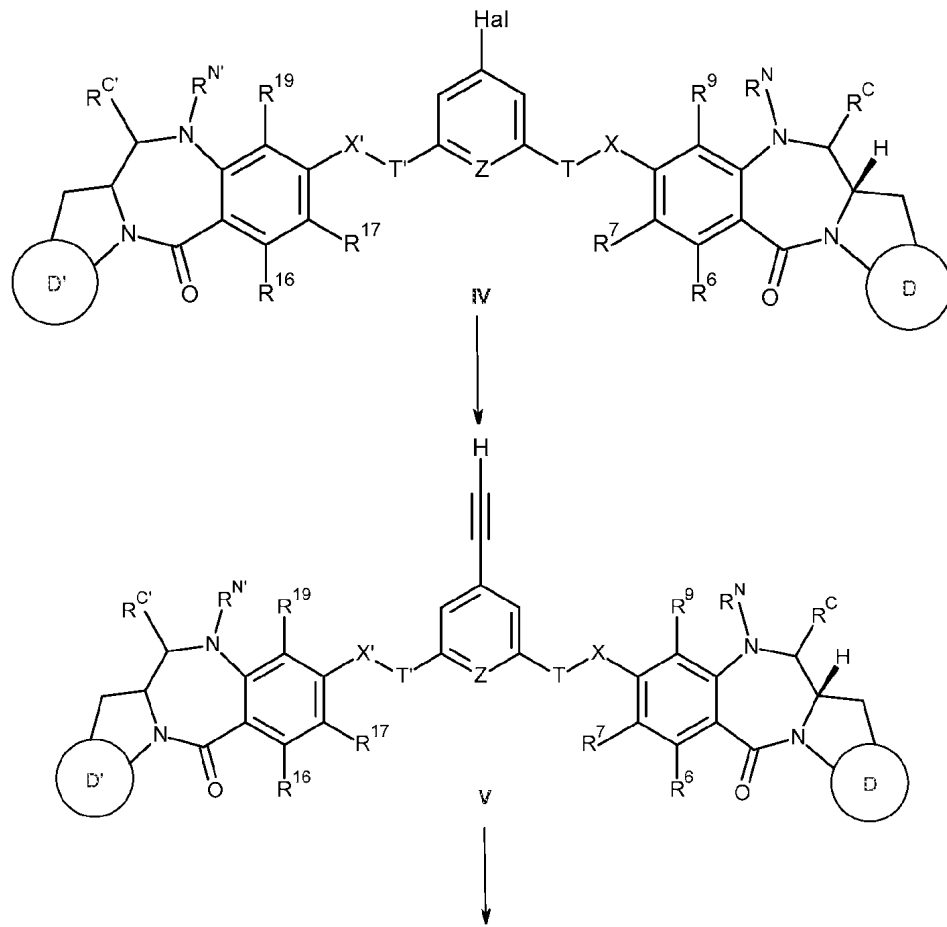
5

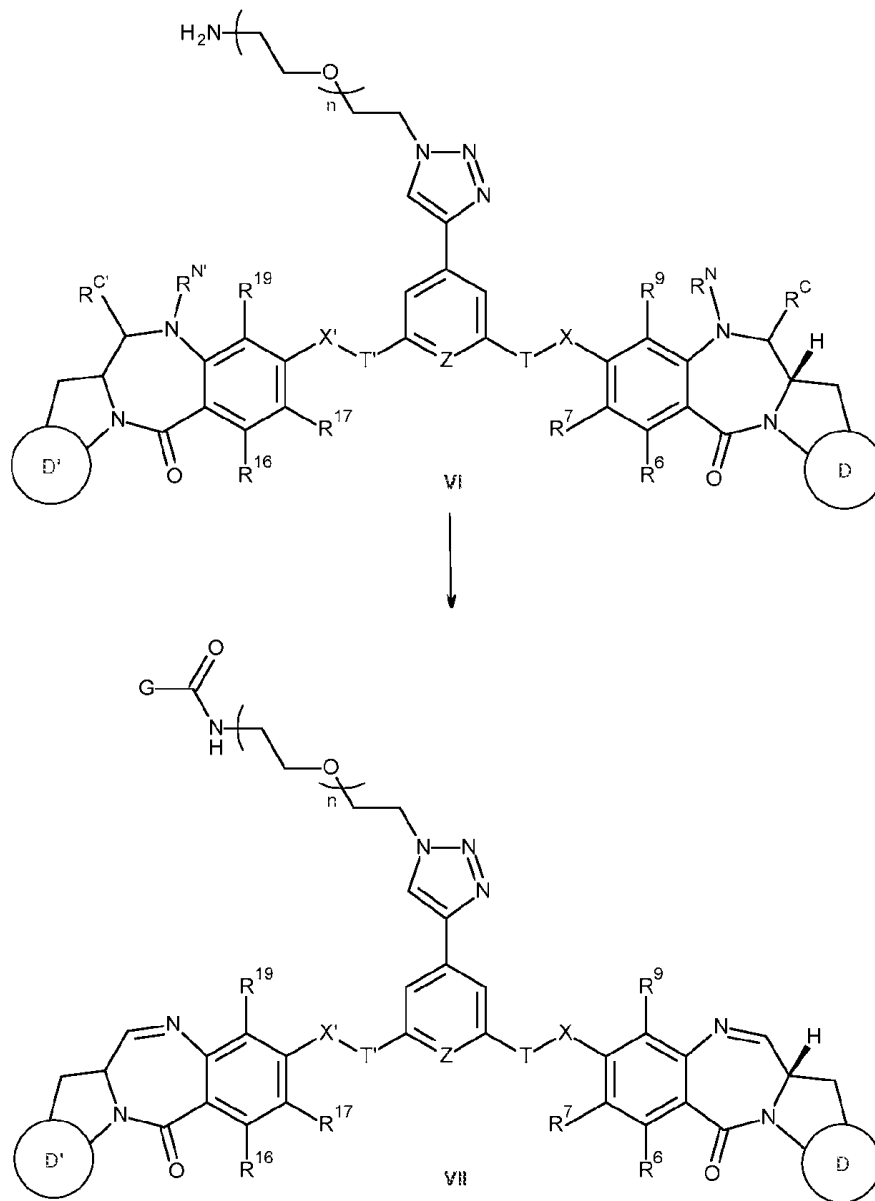
Una posible ruta de síntesis para un intermedio dimérico de fórmula IV se muestra a continuación:



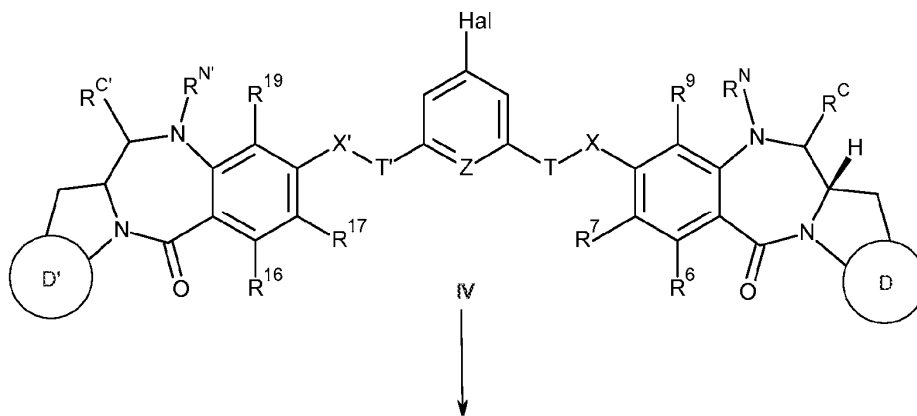
10

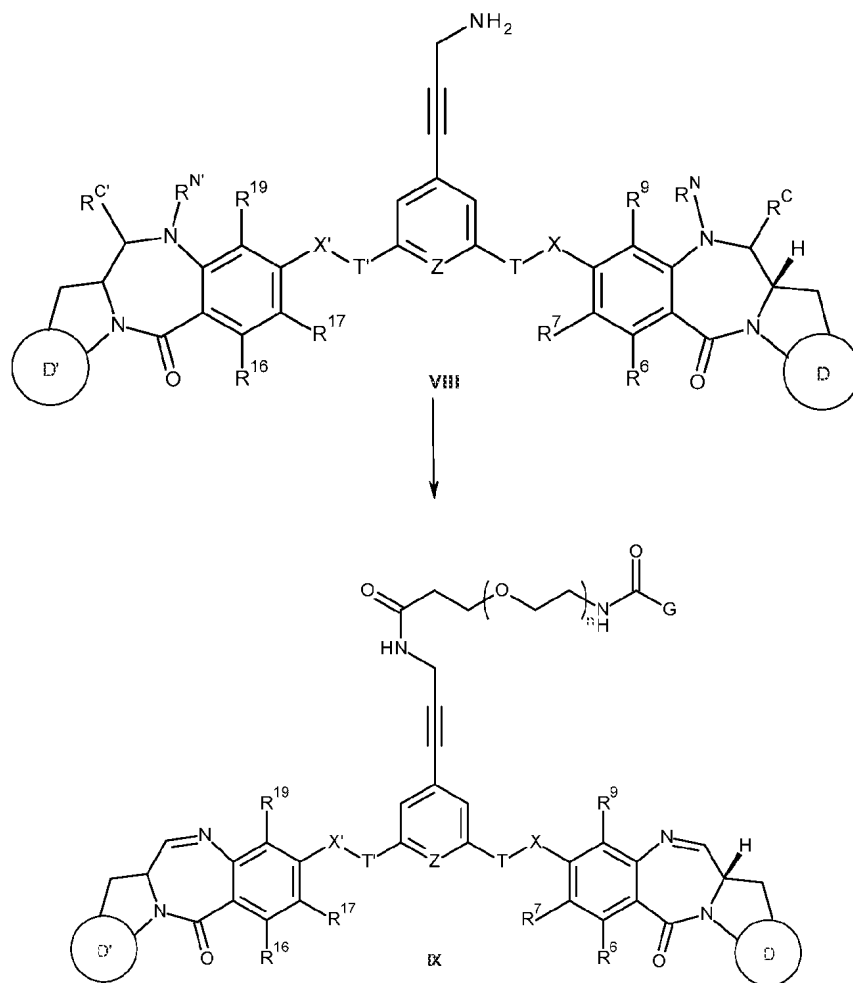
El intermedio IV puede usarse para fabricar el intermedio VII



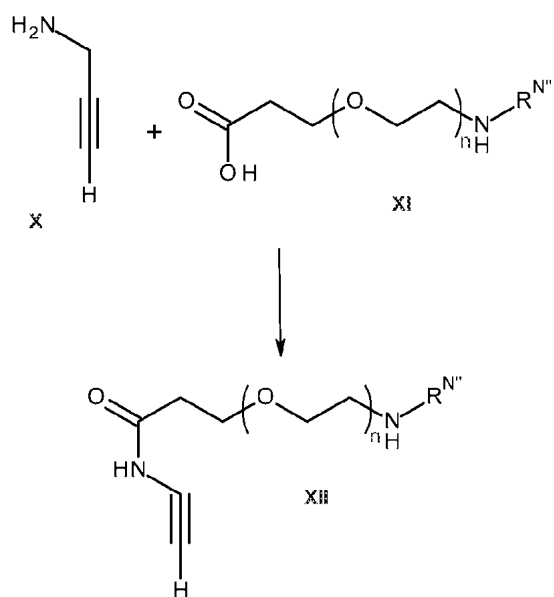


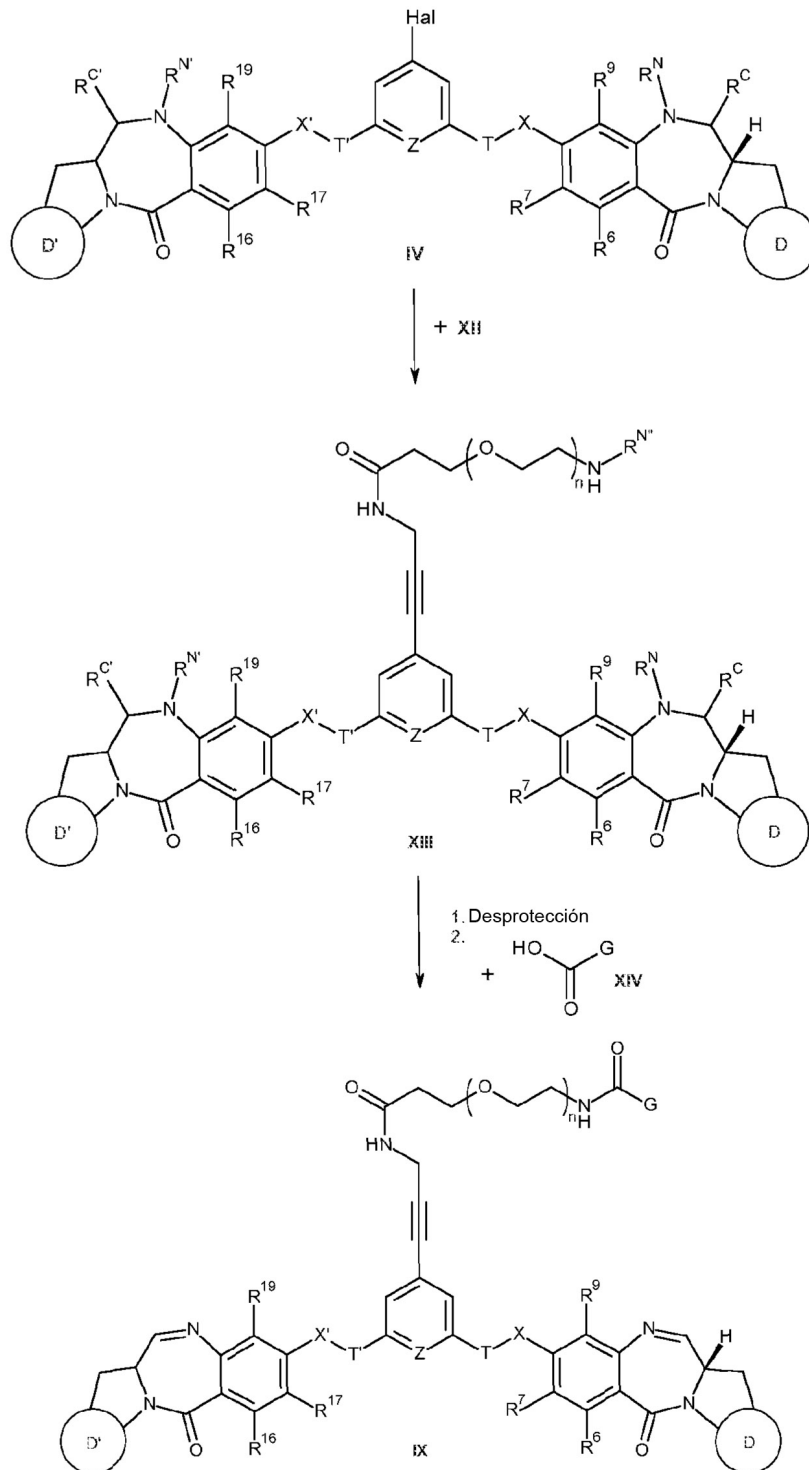
El intermedio VII puede usarse para fabricar el intermedio IX:



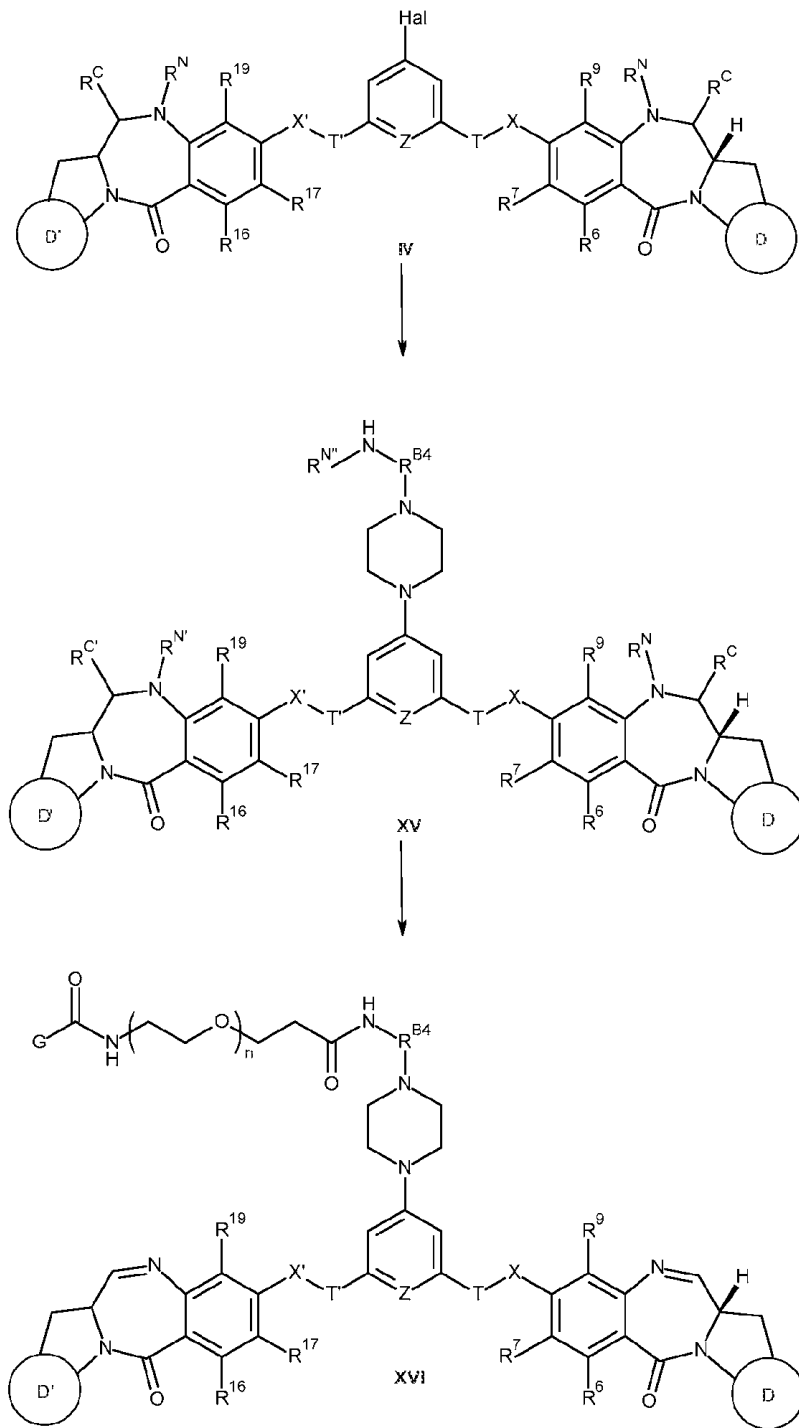


Alternativamente, el intermedio IV puede acoplarse con el intermedio X para fabricar el intermedio IX:

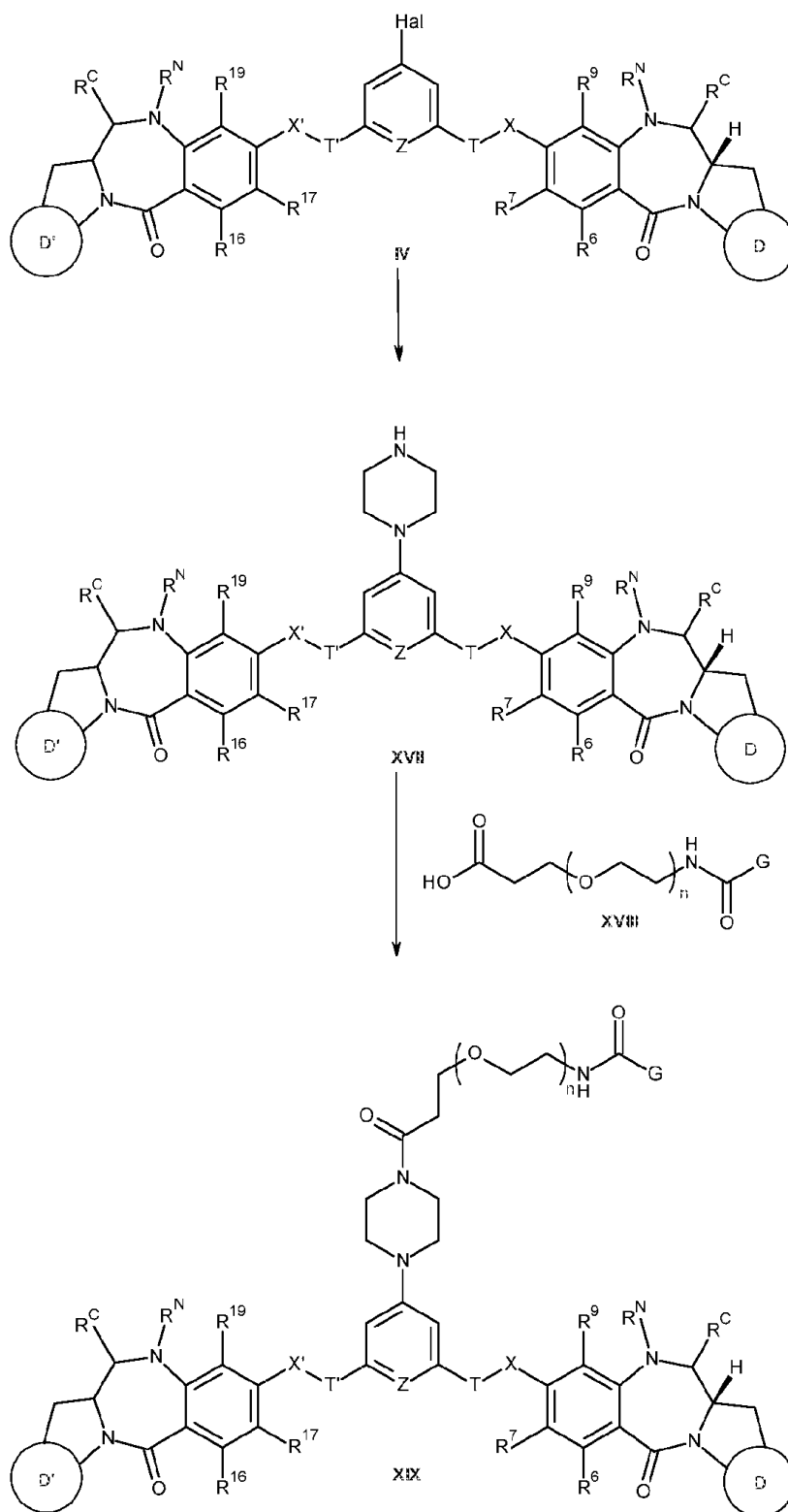




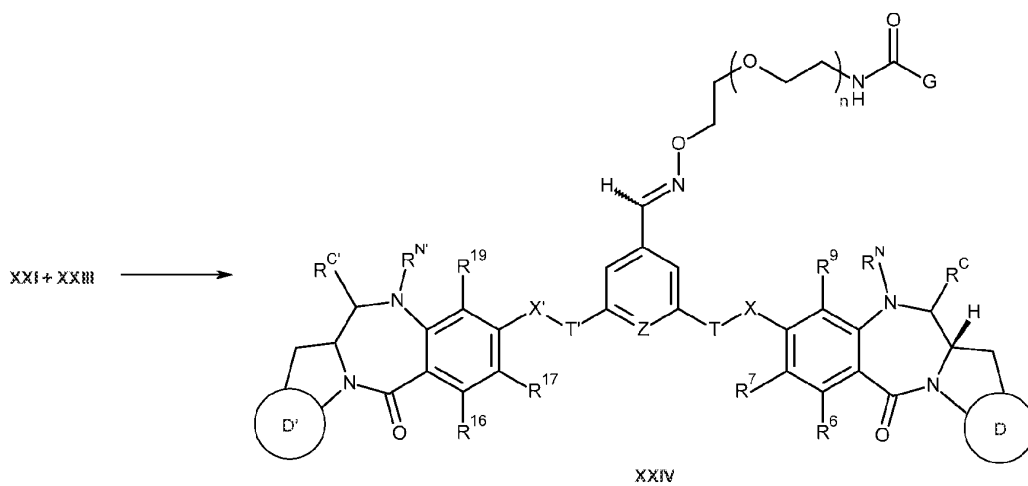
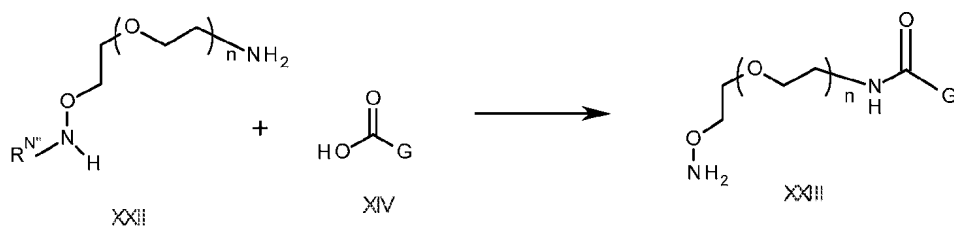
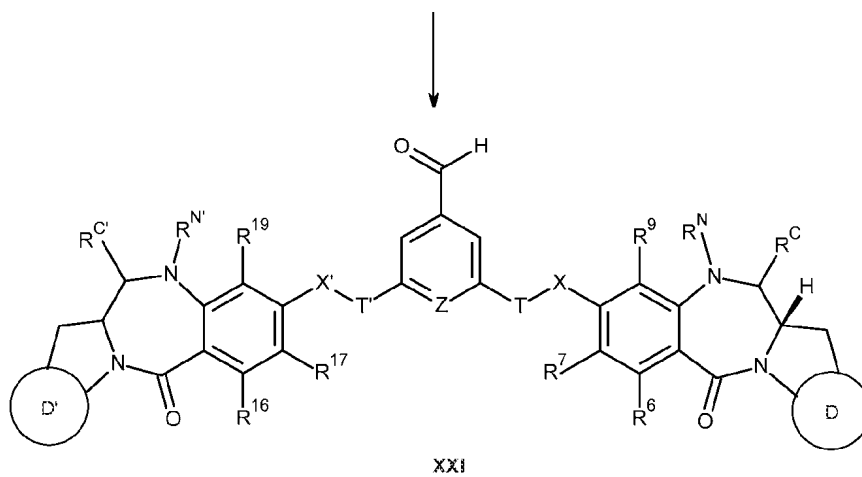
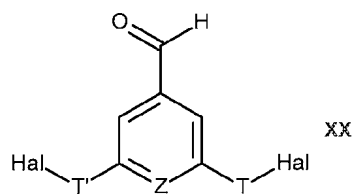
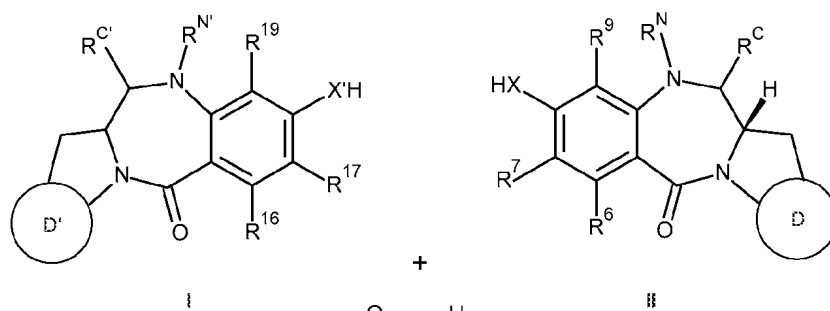
El intermedio IV puede usarse para fabricar el intermedio XVI



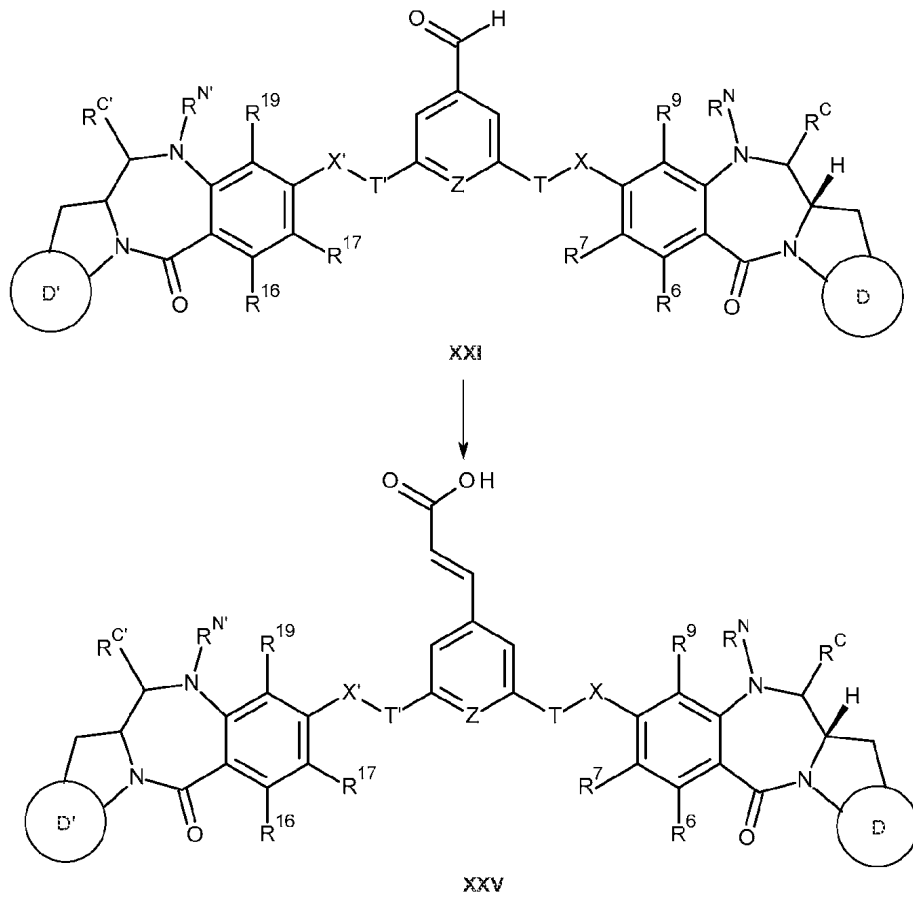
El intermedio IV puede usarse para fabricar el intermedio XIX

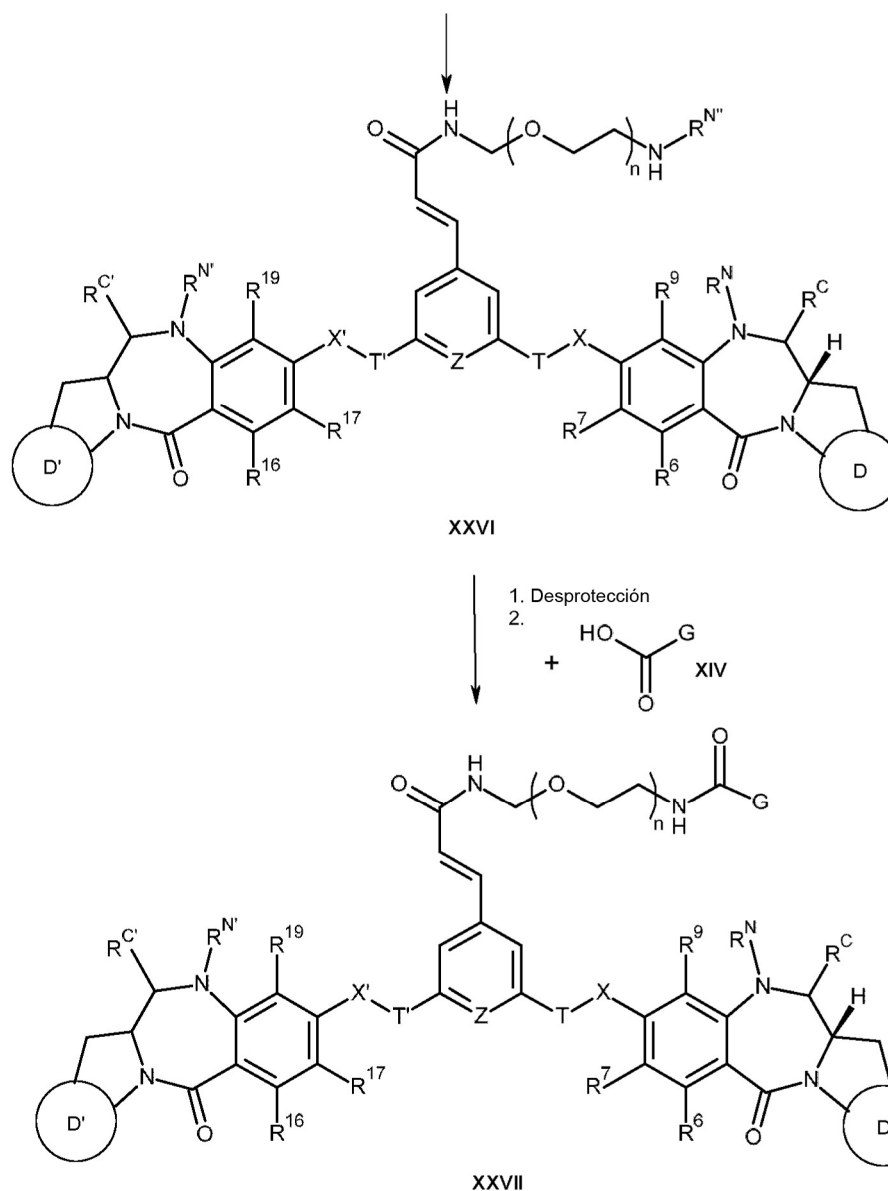


Una posible ruta de síntesis para un intermedio dimérico de fórmula XIV se muestra a continuación:



El intermedio XXI puede usarse para fabricar el intermedio XXVII:





En los esquemas anteriores, R^{N} , $\text{R}^{\text{N}'}$ y $\text{R}^{\text{N}''}$ representan cada uno independientemente un grupo protector de nitrógeno. R^{C} y $\text{R}^{\text{C}'}$ representan cada uno independientemente OH u OProt^{O} , donde Prot^{O} es un grupo protector hidroxilo. Los grupos protectores se conocen bien en la técnica. R^{N} , $\text{R}^{\text{N}'}$ y $\text{R}^{\text{N}''}$ pueden ser, por ejemplo, BOC. Prot^{O} puede ser THP. Puede ser que la protección de los enlaces imina N10-C11 se retire a una fase diferente en los métodos de síntesis a aquellos mostrados anteriormente, dependiendo de las químicas empleadas.

En general, los compuestos y conjugados pueden prepararse enlazando primero dos monómeros de PBD con un puente de dímero de fenileno o piridileno para producir el intermedio IV o XXI. El grupo halógeno en el anillo arilo en el puente dimérico de intermedio IV puede usarse después para formar el téter (incluyendo el grupo G o L enlazador) para conectar el dímero de PBD al agente de unión de células.

Con más detalle, dos monómeros de PBD con grupos $-\text{XH}$ y $\text{X}'\text{H}$ en la posición C8 de cada monómero de PBD (intermedios I y II, respectivamente) pueden hacerse reaccionar con grupos $-\text{T}-\text{Hal}$ y $-\text{T}'-\text{Hal}$ en el intermedio III o el intermedio XX. Un método tal de síntesis permite que los monómeros de PBD sean diferentes y de esta manera el dímero de PBD resultante es asimétrico. Igualmente, los monómeros de PBD pueden ser el mismo.

El intermedio IV de dímero de PBD puede usarse para proporcionar los compuestos y los conjugados de la presente invención haciendo reaccionar el grupo halógeno de arilo en el puente en una serie de maneras.

En primer lugar, el intermedio IV puede usarse en una reacción de acoplamiento cruzado de Sonogishira para proporcionar un grupo acetileno en el grupo arilo del puente dimérico. Las reacciones de acoplamiento cruzado de Sonogishira se conocen bien en la técnica para acoplar un alquino terminal con un haluro de arilo en presencia de un

catalizador de paladio, tales como Pd(Ph₃)₄, un catalizador de cobre, tales como CuI y una base, tales como dietilamina.

5 Cuando el acetileno ha de usarse como el acetileno terminal, un lado de la molécula de acetileno está normalmente protegida, por ejemplo, con TMS para evitar el reticulamiento de los dímeros de PBD. Una vez que se completa la reacción de Sonogishira, el grupo TMS puede escindirse para proporcionar el intermedio V de alquino.

10 El intermedio V puede hacerse reaccionar con un compuesto azido para formar un derivado triazol en una cicloadición de Huisgen de azida-alquino. Una reacción tal puede catalizarse por un catalizador de cobre. Para formar los compuestos y los conjugados de la presente invención, la azida se une a un grupo etileno y un número variable de grupos PEG. La azida puede terminarse con un grupo amina para reaccionar adicionalmente. La reacción del intermedio V con un compuesto amino-azida proporcionará el intermedio VI.

15 El grupo amina libre del intermedio VI puede hacerse reaccionar después con un grupo ácido carboxílico de un grupo enlazador para conectar a una unidad de unión a células para formar el grupo amido que enlaza el dímero de PBD con el grupo enlazador G o L para proporcionar el compuesto VII.

20 El grupo conector/grupo reactivo, G, del intermedio VII puede conjugarse a un agente de unión a células para proporcionar conjugados de la presente invención.

25 Como una alternativa a la reacción de Sonogishira, el intermedio IV puede acoplarse a una acetilamina, tales como propargilamina en presencia de catalizadores de paladio y cobre y base. Una reacción tal proporciona parte de un téter fijado al puente de dímero de PBD donde el grupo acilina se conserva y una amina terminal libre está disponible para reacción adicional. Por ejemplo, la reacción del intermedio IV con propargilamina proporciona el intermedio VIII.

La amina terminal del intermedio VIII puede hacerse reaccionar, por ejemplo, con un grupo ácido carboxílico fijado a un grupo enlazador/reactivo G (para conectar a un agente de unión a células) para proporcionar el intermedio IX.

30 Como una síntesis alternativa del intermedio IX, el grupo ácido carboxílico del intermedio XI puede hacerse reaccionar con propargilamina para formar el intermedio XII. La reacción del intermedio IV con el intermedio XII en una reacción de Sonogishira produce el intermedio XIII.

35 El grupo amina protegido terminado en la cadena de PEG variable puede desprotegerse y hacerse reaccionar con el grupo ácido carboxílico del intermedio XIV para acoplarse al grupo enlazador/reactivo G en el dímero PBD y producir el intermedio XIV.

40 El intermedio IV también puede usarse en una reacción de aminación de acoplamiento cruzado, tales como una aminación de Buchwald-Hartwig. Se forma un enlace carbono-nitrógeno a través de un acoplamiento cruzado catalizado por paladio de una amina con un haluro de arilo. Se conoce una serie de catalizadores de paladio para su uso en tales reacciones de acoplamiento cruzado, tales como Pd(Ph₃)₄ o RuPhos/RuPhosPd.

45 La reacción del intermedio IV con una piperazina funcionalizada con una propan-1-amina protegida proporciona el intermedio XV. La amina protegida del intermedio XV puede hacerse reaccionar además, por ejemplo, con un grupo ácido carboxílico fijado a un grupo enlazador/reactivo, G, para conectar a un agente de unión a células para proporcionar el intermedio XVI.

50 La reacción de aminación de acoplamiento cruzado, tales como una aminación de Buchwald-Hartwig, del intermedio IV con una piperazina parcialmente protegida seguida de desprotección (por ejemplo, con ácido trifluoroacético) proporciona el intermedio XVII.

El grupo amina piperazina desprotegido del intermedio XVII puede hacerse reaccionar con un grupo ácido carboxílico en el intermedio XVIII para proporcionar el intermedio XIX.

55 El intermedio XXI puede usarse para formar el intermedio oxima XXIV. Por ejemplo, una PEG-diamina parcialmente protegida, intermedio XXII, puede hacerse reaccionar con el grupo ácido carboxílico del intermedio XIV. La desprotección produce el intermedio XIII.

La reacción de los intermedios XXI y XXIII produce el intermedio oxima XXIV. Las oximas sin y anti pueden resolverse usando HPLC preparativa.

60 El intermedio XXI puede usarse también para formar el intermedio acrilamida XXVII. Por ejemplo, el intermedio aldehído XXI puede hacerse reaccionar con ácido malónico en una condensación de Knoevenagel para producir el intermedio ácido acrílico XXV. Este puede hacerse reaccionar con una diamina parcialmente protegida con PEG para producir el intermedio XXVI. La desprotección y el acoplamiento con el intermedio XIV producen el intermedio acrilamida XXVII.

65

La síntesis de compuestos de PBD que contienen dos restos de imina se trata extensamente en las referencias siguientes:

- a) documento WO 00/12508 (páginas 14 a 30);
- 5 b) documento WO 2005/023814 (páginas 3 a 10);
- c) documento WO 2005/085259 (páginas 31 a 39)
- d) documento WO 2011/128650 (páginas 2 a 12 y 42 a 51);
- e) documento PCT/EP2012/070232, enviada el 12 de octubre de 2012 (páginas 2 a 15 y 49 a 58).

10 Ejemplos

Métodos experimentales generales

15 Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se dan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato de punto de fusión digital (Electrothermal). Los espectros IR se registraron en un Espectrómetro Spectrum 1000 FT IR de Perkin-Elmer. Los espectros ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se informan con respecto a TMS ($\delta = 0,0$ ppm) y las señales se designan s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (triplete doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doble doblote de dobletes) o m (multiplete), con las constantes de acoplamiento dadas en Hercios (Hz). Los datos de espectroscopía de masas (EM) se recogen usando un instrumento Waters Micromass ZQ acoplado a un Waters 2695 HPLC con un Waters 2996 PDA. Los parámetros de Waters Micromass ZQ usados fueron: Capilares (kV), 3,38; Cono (V), 35; Extractor (V), 3,0; Temperatura de la fuente (°C), 100; Temperatura de desolvatación (°C), 200; Caudal del cono (l/h), 50; Caudal de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un Waters Micromass QTOF Global en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas con metal para introducir las muestras en el instrumento. Se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) en placas de aluminio con gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄) y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merk 60, malla 230-400 ASTM). Todos los productos químicos y disolventes se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se usaron según se suministraron sin purificación adicional.

30 Condiciones de CL/EM - Método A: 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, después 5 % de B hasta 95 % de B en 3 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de B y después se volvió al 5 % de B en 0,3 minutos. El tiempo total de ejecución del gradiente fue de 5 min. El caudal fue de 3,0 ml/min, se dividieron 400 μ l mediante una pieza en T de volumen muerto que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de 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.

40 Condiciones de CL/EM - Método B: 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 mantenido durante 1,0 min, después se aumentó de 5 % de B hasta 95 % de B durante un periodo de 2,5 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,1 minutos y se mantuvo así durante 0,9 min. El tiempo total de ejecución del gradiente fue de 5 min. El caudal fue de 3,0 ml/min, se dividieron 400 μ l mediante una pieza en T de volumen muerto que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de 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.

50 Condiciones de CL/EM - Método C: La espectrometría de masas de electropulverizado en modo positivo se realizó usando un Shimadzu Nexera®/Prominence® LCMS-2020. Las fases móviles usadas fueron disolvente A (H₂O con ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B (CH₃CH con ácido fórmico al 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B mantenido durante 0,25 min, después se aumentó de 5 % de B hasta 100 % de B durante un periodo de 2 min. La composición se mantuvo durante 0,50 min al 100 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,05 minutos y se mantuvo así durante 0,05 min. El tiempo total de ejecución del gradiente fue de 3,0 min. El caudal fue de 0,8 ml/min. La detección fue a 214 y 254 nm. Columna: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 μ m 2,1 x 50 mm a 50 °C.

55 Las condiciones de HPLC preparativa para los Ejemplos de Referencia 2 y 3 fueron como sigue: La cromatografía líquida de alto rendimiento ultra-rápida en fase inversa (UFLC) se llevó a cabo en una máquina Shimadzu Prominence® usando columnas Phenomenex® Gemini NX 5 μ C18 (a 50 °C) de las siguientes dimensiones: 150 x 4,6 mm para análisis y 150 x 21,2 mm para trabajo preparativo. Los eluyentes usados fueron disolvente A (H₂O con ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B (CH₃CH con ácido fórmico al 0,1 %). Todos los experimentos de UFLC se realizaron con condiciones de gradiente: De 0 a 30 min la composición de B se aumentó de 0 a 100 % y se mantuvo a 100 % durante 2 min adicionales. La composición de B se disminuyó de 100 % a 0 % de 32,0 min a 32,1 min y se mantuvo a 0 % de B hasta 35,0 min. La duración total de la ejecución del gradiente fue 35,0 min. Los caudales usados fueron 1,0 ml/min para HPLC analítica y 20,0 ml/min para preparativa. La detección fue a 254 y 280 nm.

65 Condiciones de CL/EM - Método D: Shimadzu LCMS-2020, usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico al 0,1

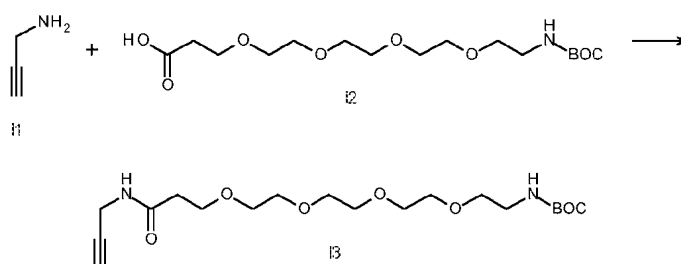
5 % y acetonitrilo (B) (ácido fórmico al 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B mantenido durante 0,25 min, después se aumentó de 5 % de B hasta 100 % de B durante un periodo de 2 min. La composición se mantuvo durante 0,50 min al 100 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,05 minutos y se mantuvo así durante 0,05 min. El tiempo total de ejecución del gradiente fue de 3 minutos. El caudal fue de 0,8 ml/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Temperatura del horno: 50 °C. Columna: Kinetex 2,6u XB-C18 100A 50x2,10 mm.

Condiciones de CL/EM - Método E: 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 mantenido durante 1 min, después se aumentó de 5 % de B hasta 100 % de B durante un periodo de 9 min. La composición se mantuvo durante 2 min al 100 % de B, después se volvió al 5 % de B en 0,10 minutos y se mantuvo así durante 3 min. El tiempo total de ejecución del gradiente fue de 15 minutos. El caudal fue de 0,6 ml/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 190 a 800 nm. Temperatura del horno: 50 °C. Columna: Gemini-NX 3u C18 110A 100x2,00 mm.

Síntesis de intermedios

15

(15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azanonadec-18-in-1-il)carbamato de terc-butilo (I3)



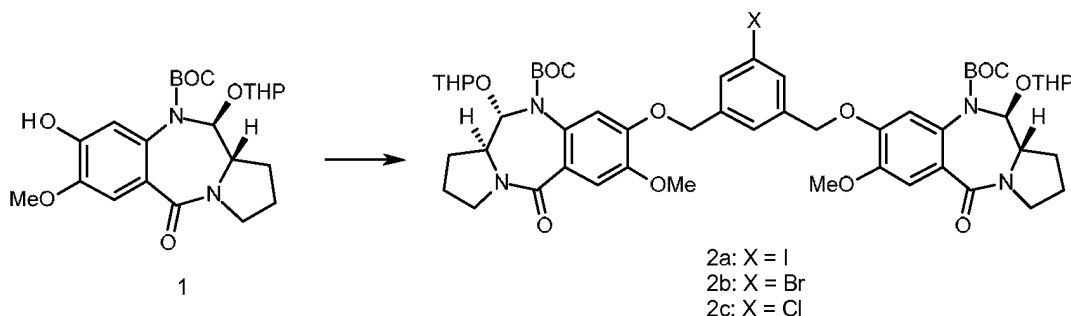
20 Se añadió EDCI (263 mg, 1,37 mmol, 1 eq) a una solución de propargilamina (88 µl, 1,37 mmol, 1 eq) y t-boc-N-amido-dPEG₄-ácido (365,42 mmol, 1,37 mmol, 1 eq) en diclorometano (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas después de lo que la conversión completa se observó por TLC. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 0 % a 10 % de metanol en diclorometano). Se recogieron las fracciones puras y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria para dar el producto I3 (490 mg, 89 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,90 (s, 1H), 5,06 (d, J = 23,2 Hz, 1H), 4,03 (dd, J = 5,3, 2,5 Hz, 2H), 3,72 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 3,69 - 3,57 (m, 12H), 3,53 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,30 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 2,49 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,20 (t, J = 2,5 Hz, 1H), 1,43 (s, 9H).

30

Ejemplo de referencia 1

(a) 8,8'-(((5-halo-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S, 11aS, 11'S, 11a'S)-di-terc-butilo (2a, 2b, 2c)

35



40 (i) 8,8'-(((5-yodo-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1Hpirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (2a) Se añadió 1,3-bis(bromometil)-5-yodobenceno (906 mg, 2,34 mmol) a una solución agitada de unidad 1 de protección con caperuza de PBD protegido con Boc/THP (2,1 g, 4,68 mmol), TBAI (86 mg, 0,234 mmol) y K₂CO₃ (647 mg, 4,68 mmol) en DMF seco (30 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 3 horas en cuyo punto el análisis por CL/EM reveló formación sustancial de producto a tiempo de retención 4,00 min (ES+) m/z 1125 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~50 %). La mezcla de reacción se permitió enfriar a temperatura ambiente y el DMF se retiró por evaporación al vacío. El residuo resultante se repartió entre agua (50 ml) y EtOAc (50 ml) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x

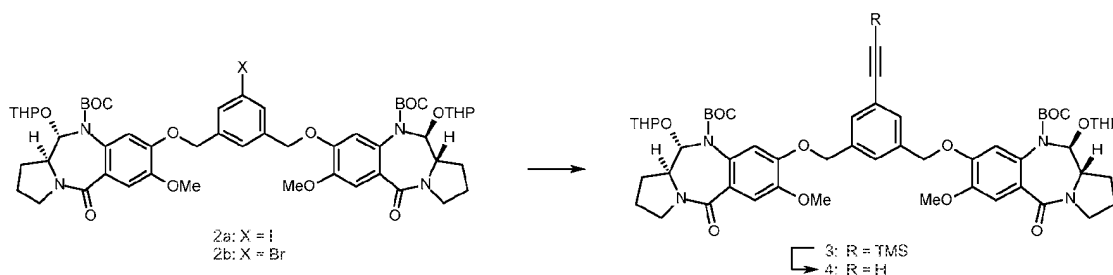
45

15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 20 ml), salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución de gradiente: 50:50 v/v EtOAc/hexano al 100 % de EtOAc) dio el bis-éter **2a** como una espuma blanca (2,05 g, 78 % de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (mezcla de 3 diastereoisómeros) δ 7,78-7,74 (m, 2H), 7,50 (d, 1H, J = 4,76 Hz), 7,26 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,80 (d, 1H, J = 8,52 Hz), 5,70 (d, 1H, J = 9,44 Hz), 5,16-4,95 (m, 6H), 3,93-3,87 (m, 8H), 3,74-3,40 (m, 8H), 2,22-1,99 (m, 8H), 1,79-1,22 (m, 30H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (mezcla de 3 diastereoisómeros) δ 167,4, 167,2, 154,9, 149,6, 149,4, 149,2, 148,8, 139,6, 139,4, 135,6 (x2), 129,8, 129,6, 127,9, 127,4, 125,0, 116,0, 115,8, 111,0, 110,4, 100,8, 95,8, 94,8, 91,2, 88,2, 81,4, 80,9, 70,4, 70,0, 64,9, 63,4, 60,2, 60,0, 56,2, 56,1 (x2), 46,3, 31,4, 30,9, 29,2, 28,9, 28,2, 28,1, 25,3, 23,3, 23,2, 20,9, 19,9.

(ii) **8,8'-(((5-bromo-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de 11S,11aS,11'S,11'a'S)-di-terc-butilo (2b)**. Se añadió 1-bromo-3,5-bis(bromometil)benceno (331 mg, 0,97 mmol) a una solución agitada de unidad **1** de protección con caperuza de PBD protegido con Boc/THP (270 mg, 1,95 mmol), TBAI (36 mg, 97,4 μmol) y K₂CO₃ (270 mg, 1,95 mmol) en DMF seco (16 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 2,5 horas en cuyo punto el análisis por CL/EM reveló formación sustancial de producto a tiempo de retención 4,00 min (ES+) m/z 1079 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~95 %). La mezcla de reacción se permitió enfriar a temperatura ambiente y el DMF se retiró por evaporación al vacío. El residuo resultante se repartió entre agua (25 ml) y DCM (25 ml) y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 x 10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), salmuera (30 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución de gradiente: 50:50 v/v EtOAc/hexano al 100 % de EtOAc) dio el bis-éter **2b** como una espuma blanca (725 mg, 69 % de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) (mezcla de 3 diastereoisómeros) δ 7,57-7,53 (m, 2H), 7,50 (d, 1H, J = 4,92 Hz), 7,27 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,80 (d, 1H, J = 7,88 Hz), 5,70 (d, 1H, J = 9,36 Hz), 5,18-4,94 (m, 6H), 3,93-3,85 (m, 8H), 3,75-3,40 (m, 8H), 2,14-1,99 (m, 8H), 1,79-1,22 (m, 30H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) (mezcla de 3 diastereoisómeros) δ 167,4, 167,2, 154,9, 149,6, 149,4, 149,2, 148,8, 139,6, 139,4, 129,8, 127,9, 128,0, 127,4, 124,2, 123,2, 116,0, 115,8, 111,0, 110,4, 100,9, 95,8, 91,3, 88,2, 81,3, 80,9, 70,5, 70,1, 64,9, 63,4, 60,2, 60,0, 56,2, 56,1, 46,4, 31,4, 30,9, 29,2, 28,9, 28,2, 28,1, 25,3, 23,3, 23,1, 20,9, 19,9.

(iii) **8,8'-(((5-cloro-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrol[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11'a'S)-di-terc-butilo (2c)**. Se añadió 1,3-bis(bromometil)-5-clorobenceno (470 mg, 1,57 mmol) a una solución agitada de unidad **1** de protección con caperuza de PBD protegido con Boc/THP (1,41 g, 3,15 mmol), TBAI (58 mg, 0,16 mmol) y K₂CO₃ (435 mg, 3,15 mmol) en DMF seco (20 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 2 horas en cuyo punto el análisis por CL/EM (Método A) reveló formación sustancial de producto a tiempo de retención 1,94 min (ES+) m/z 1033 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~50 %). La mezcla de reacción se permitió enfriar a temperatura ambiente y el DMF se retiró por evaporación al vacío. El residuo resultante se repartió entre agua (50 ml) y DCM (50 ml) y la fase acuosa se extrajo con DCM (3 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 20 ml), salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución de gradiente: 50:50 v/v EtOAc/hexano al 100 % de EtOAc) dio el bis-éter **2c** como una espuma blanca (825 mg, 51 % de rendimiento).

(b) **8,8'-(((5-etinil-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11'a'S)-di-terc-butilo (4)**

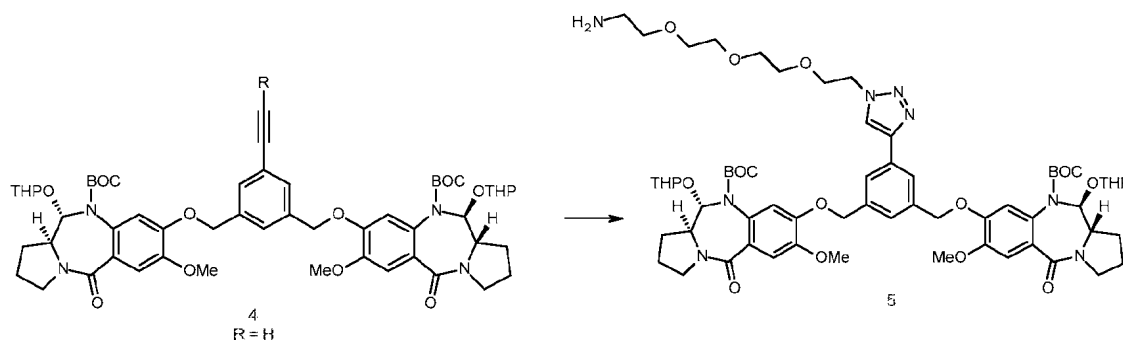


(i) **8,8'-(((5-((trimetilsilil)etinil)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11'a'S)-di-terc-butilo (3)**. Una cantidad catalítica de Pd(PPh₃)₄ (14,9 mg, 12,9 μmol) se añadió a una mezcla del bis-éter **2a** (721 mg, 0,64 mmol), TMS-acetileno (273 μl, 190 mg, 1,93 mmol), Cul (4,9 mg, 25,8 μmol), dietilamina (1,33 ml, 942 mg, 12,9 mmol) y gránulos de tamiz molecular de 4 Å secados al horno en DMF seco (4,8 ml) en un recipiente sellable secado al horno. La mezcla se desgasificó y se roció con argón 3 veces, después se calentó en un microondas a 100 °C durante 1,5 horas en cuyo punto el análisis

por CL/EM (Método A) reveló el consumo completo del material de partida y la formación sustancial de producto a tiempo de retención 4,27 min (ES+) m/z 1096 ($[M+H]^+$, intensidad relativa ~35 %). Pico en el tiempo de retención 3,82 min (ES+) m/z 1023 ($[M+H]^+$, intensidad relativa ~35 %) observado que corresponde a escisión por TMS en condiciones CL/EM (Método A). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró después a través de un sinterizador para retirar los tamices (lavado con DMF). El filtrado se evaporó al vacío y el residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (elución de gradiente: 50:50 v/v EtOAc/hexano al 100 % de EtOAc) para proporcionar el TMS-acetileno **3** como una espuma amarilla (656 mg, 93 % de rendimiento): RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 7,52-7,46 (m, 3H), 7,26 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,80 (d, 1H, $J = 8,68$ Hz), 5,69 (d, 1H, $J = 9,36$ Hz), 5,18-4,94 (m, 6H), 3,93-3,86 (m, 8H), 3,73-3,40 (m, 8H), 2,13-1,97 (m, 8H), 1,78-1,22 (m, 30H), 0,22, 0,23 y 0,24 (sx3, 9H); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 167,6, 167,4, 155,2, 155,0, 149,9, 149,6, 149,2, 148,8, 137,8, 137,6, 130,2, 129,9, 129,7, 127,8, 127,2, 125,8, 124,4, 116,0, 115,8, 111,0, 110,4, 104,4, 101,0, 95,8, 91,4, 88,3, 81,4, 81,0, 71,0, 70,6, 65,0, 63,5, 60,3, 60,1, 56,2, 46,4, 31,0, 29,2, 29,0, 28,2, 25,4, 23,4, 23,3, 21,1, 20,0, 0,28, 0,09, 0,00, -0,28.

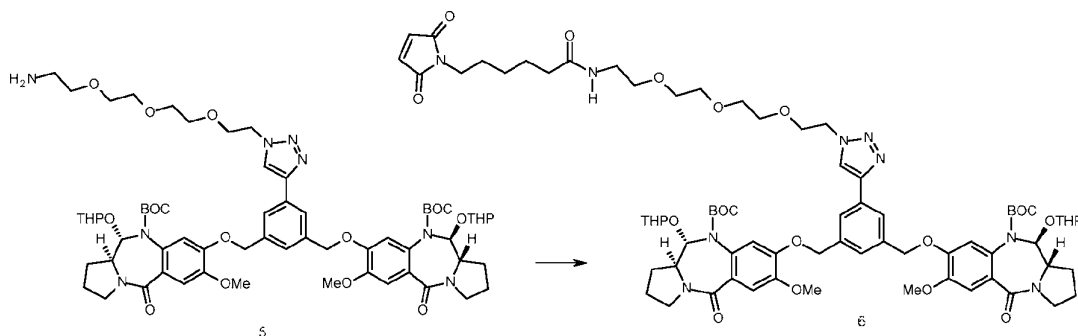
(ii) 8,8'-(((5-etinil-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (**4**). Se añadió K_2CO_3 sólido (296 mg, 2,14 mmol) a una solución agitada del compuesto **3** protegido con TMS (1,17 g, 1,07 mmol) en MeOH (20 ml). Después de 3 horas de agitación a temperatura ambiente la reacción se consideró estar completa según se juzgó por CL/EM (Método A) [pico de producto deseado a tiempo de retención 3,82 min (ES+) m/z 1023 ($[M+H]^+$; intensidad relativa ~30 %)]. El MeOH se retiró por evaporación al vacío y el residuo resultante se repartió entre agua (25 ml) y EtOAc (25 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 30 ml), salmuera (40 ml), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (elución de gradiente: 50:50 v/v EtOAc/hexano al 100 %) dio el acetileno **4** como una espuma naranja (1,02 g, 34 % de rendimiento): RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 7,55-7,52 (m, 3H), 7,26 (s, 1H), 7,22 (s, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,80 (d, 1H, $J = 8,68$ Hz), 5,69 (d, 1H, $J = 9,48$ Hz), 5,18-4,94 (m, 6H), 3,93-3,86 (m, 8H), 3,73-3,40 (m, 8H), 3,09 and 3,08 (sx3, 1H), 2,13-1,97 (m, 8H), 1,78-1,22 (m, 30H); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 167,5, 167,3, 155,2, 149,7, 149,5, 149,1, 148,8, 137,8, 137,7, 130,3, 129,8, 129,6, 127,8, 127,2, 126,1, 123,2, 115,9, 115,7, 110,9, 110,4, 100,9, 100,0, 95,7, 91,3, 88,2, 82,9, 81,3, 80,9, 78,0, 70,7, 70,4, 64,9, 63,4, 60,2, 60,0, 56,1, 46,3, 31,4, 30,9, 29,2, 28,9, 28,1 (x2), 25,3, 23,3, 23,2, 20,9, 19,9.

(c) 8,8'-(((5-(1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (**5**).



Se añadieron $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (10,3 mg, 41,4 μ mol) sólido y (+)-L-ascorbato sódico (33,0 mg, 0,17 mmol) a una solución agitada de 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amina (181 mg, 164 μ l, 0,83 mmol) y el alquino **4** (846 mg, 0,83 mmol) en *tert*-BuOH (5 ml) y H_2O (5 ml) a temperatura ambiente. Se observó un cambio de color de amarillo a verde conforme la reacción avanzaba. Después de agitar durante 1,5 horas el análisis por CL/EM (Método A) reveló una cantidad sustancial de producto deseado que correspondía al pico en el tiempo de retención 3,02 min (ES+) m/z 1242 ($[M+H]^+$; intensidad relativa ~35 %). [NOTA: En algunas ocasiones el avance de la reacción se estancó, sin embargo, la reacción se dirigió a completarse tras la adición de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,05 equivalentes) y (+)-L-ascorbato sódico (0,2 equivalentes) adicionales]. La mezcla de reacción se repartió (sin agitación del embudo de separación) entre agua (50 ml) y EtOAc (50 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 20 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), salmuera (30 ml), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto **5** como una espuma verde (817 g, 80 % de rendimiento bruto). El producto bruto se llevó hacia la siguiente etapa sin purificación adicional: RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 7,98-7,83 (m, 3H), 7,55-7,48 (s a, 1H), 7,31-7,22 (m, 2H), 6,96 (s a, 1H), 6,57 (s, 1H), 5,85-5,78 (m, 1H), 5,72-5,68 (m, 1H), 5,18-4,94 (m, 6H), 4,60-4,50 (m, 2H), 3,93-3,80 (m, 12H), 3,73-3,40 (m, 12H), 2,13-1,80 (m, 8H), 1,71-1,10 (m, 30H).

(d) 8,8'-(((5-(1-(18-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaoctadecil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS,11S,11a'S)-di-terc-butilo (6).



5

Se añadió éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido 6-maleimido-hexanoico (136 mg, 0,44 mmol) sólido a una solución agitada de la amina primaria **5** (523 mg, 0,42 mmol) en DCM seco (10 ml) a temperatura ambiente. El progreso se monitorizó por CL/EM (Método A) y después de 3 días agitando la reacción no avanzó más, se observó una cantidad sustancial de producto deseado a tiempo de retención 3,48 min (ES+) *m/z* 1434 ($[M+H]^+$; intensidad relativa ~30 %) acompañado de un pico hombro a tiempo de retención 3,40 min y material de partida sin reaccionar a tiempo de retención 3,02 min. La mezcla de reacción se trató con gel de sílice y el disolvente se retiró por evaporación al vacío. El residuo resultante se sometió a cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 100 % de DCM a 97:3 v/v DCM/MeOH) para dar la maleimida **6** como una espuma blanca (253 mg, 42 % rendimiento): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 8,05-7,99 (m, 1H), 7,92-7,87 (m, 2H), 7,56, 7,55 y 7,53 (sx3, 1H), 7,26 y 7,22 (sx2, 2H), 6,94 (s, 1H), 6,66 (s, 2H), 6,58 (s, 1H), 6,04 (s a, 1H), 5,80 (d, 1H, $J = 6,88$ Hz), 5,70 (d, 1H, $J = 9,16$ Hz), 5,24-4,94 (m, 6H), 4,60 (t, 2H, $J = 4,68$ Hz), 3,95-3,86 (m, 10H), 3,69-3,37 (m, 22H), 2,15-1,97 (m, 10H), 1,75-1,22 (m, 36H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (mezcla de 3 diastereómeros) δ 172,8, 170,8, 167,6, 167,4, 149,1, 137,9, 134,1, 129,8, 124,2, 115,8, 115,6, 110,3, 95,8, 71,1, 70,8, 70,6, 70,5 (x2), 70,2, 69,9, 69,5, 63,4, 60,2, 56,1, 53,4, 50,5, 46,4, 39,1, 37,7, 36,3, 31,4, 30,9, 29,2, 28,9, 28,3, 28,1, 26,4, 25,3 (x2), 25,1, 23,3, 23,2, 19,9.

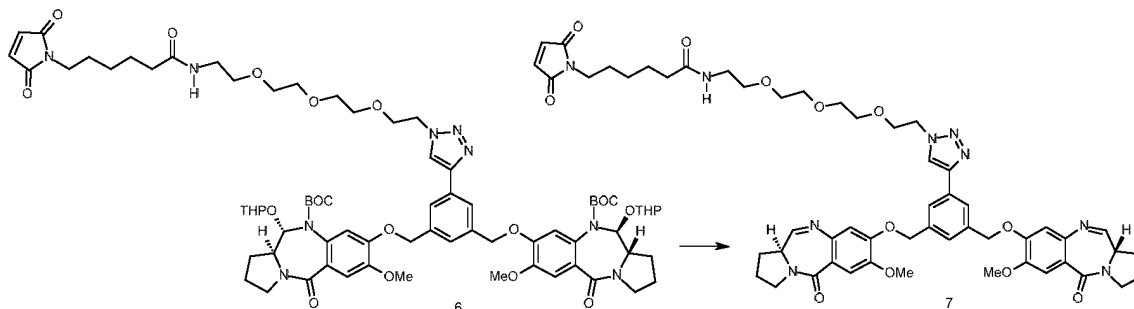
10

15

20

(e) *N*-(2-(2-(2-(4-(3,5-bis(((*S*)-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etil)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida (7).

25

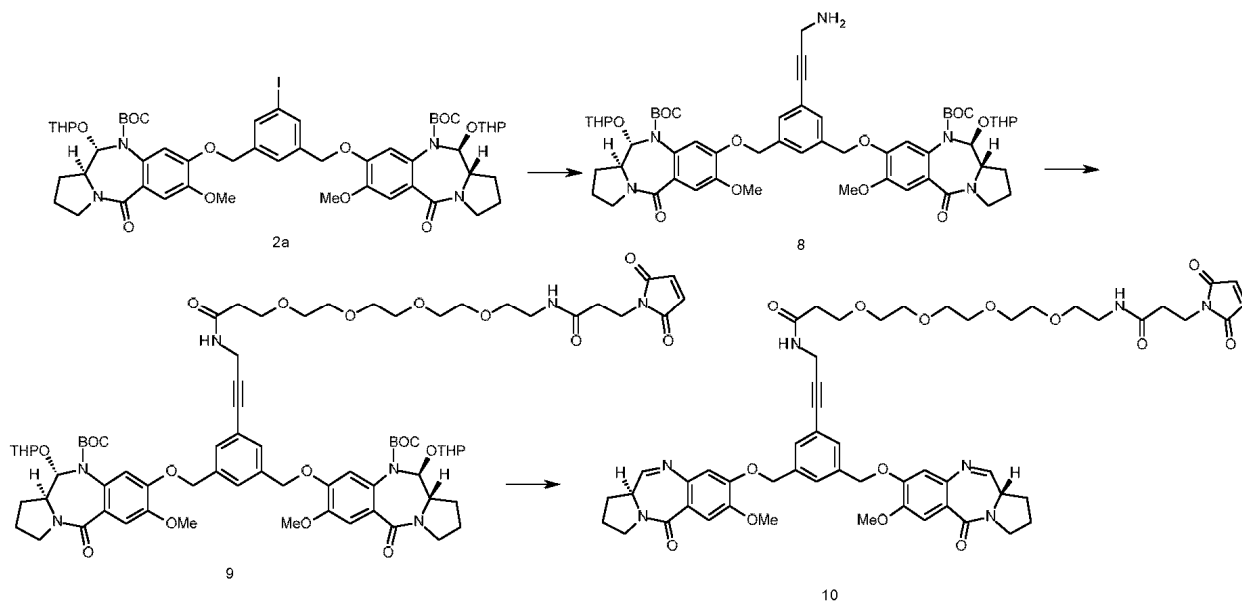


Una solución de TFA/ H_2O 95:5 v/v (3 ml) se añadió a una muestra del compuesto **6** protegido Boc/THP (253 mg, 0,18 mmol) a 0 °C (hielo/acetona). Después de agitar a 0 °C durante 1 hora la reacción se consideró completa según se juzgó por CL/EM (Método A), pico de producto deseado a tiempo de retención 2,63 min (ES+) *m/z* 1030 ($[M+H]^+$; intensidad relativa ~30 %). La mezcla de reacción se mantuvo fría y se añadió gota a gota a una solución acuosa saturada enfriada de NaHCO_3 (50 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 100 % de CHCl_3 a 97:3 v/v $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) dio el compuesto del título como una espuma naranja (127 mg, 70 % de rendimiento).

30

35

Ejemplo de referencia 2



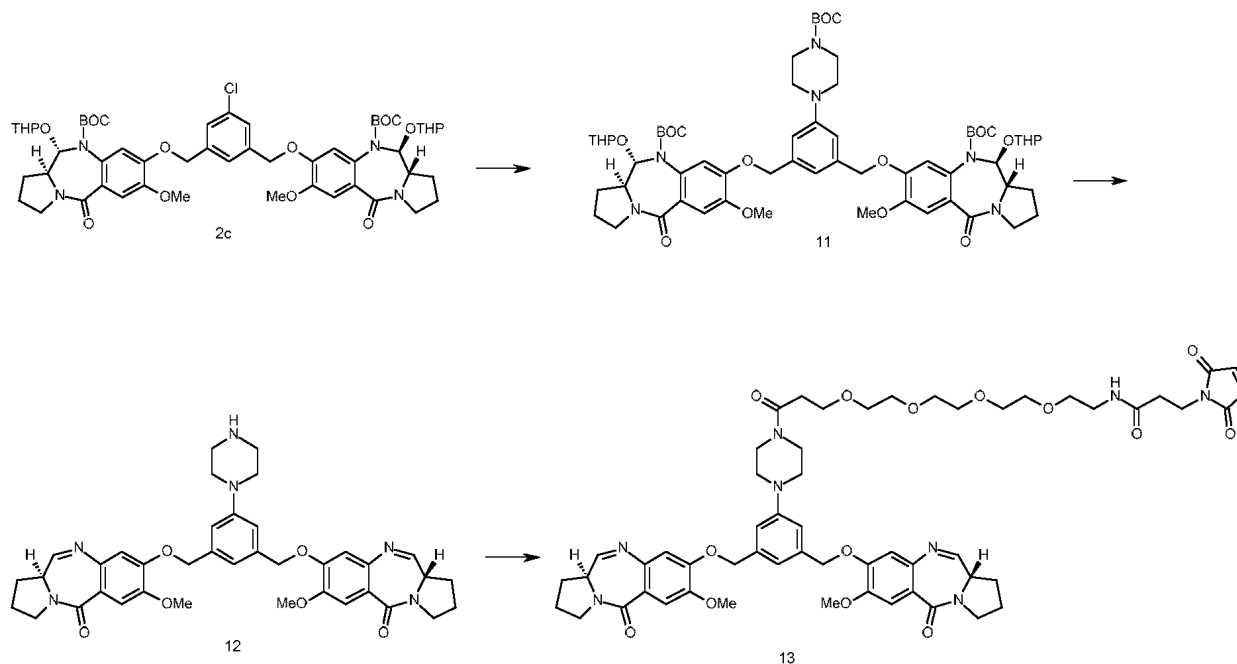
5 (a) 8,8'-(((5-(3-aminoprop-1-in-1-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (8) Se añadió una cantidad catalítica de Pd(PPh₃)₄ (2,05 mg, 1,75 μmol) a una mezcla del bis-éter 2a (100 mg, 0,089 mmol), propargilamina (17 μl, 15 mg, 0,26 mmol), CuI (0,65 mg, 3,5 μmol), dietilamina (18 μl, 13 mg, 1,75 mmol) y gránulos de tamiz molecular de 4 Å secados al horno en DMF seco (1,5 ml) en un recipiente sellable secado al horno. La mezcla se desgasificó y se roció con argón 3 veces, después se calentó a 100 °C durante 2 horas en el recipiente sellado. En este punto, el análisis por CL/EM (Método C) reveló el consumo completo del material de partida y la formación sustancial de producto a tiempo de retención 1,36 min (ES+) m/z 1052,95 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~100 %). La mezcla de reacción se permitió enfriar a temperatura ambiente y después se filtró a través de un sinterizador para retirar los tamices (lavados con DMF). El filtrado se evaporó al vacío para proporcionar producto 8 bruto inestable, que se usó inmediatamente en la siguiente etapa sin purificación o análisis.

20 (b) 8,8'-(((5-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,19-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-4,20-diazatricos-22-in-23-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (9) Se añadió MAL-dPEG@4-ácido (37 mg, 0,089 mmol) a una solución agitada de EDCI (17 mg, 0,089 mmol) y la amina primaria 8 bruta en DCM seco (4 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 3 horas en cuyo punto el análisis por CL/EM (Método C) mostró una cantidad sustancial de producto deseado a tiempo de retención 1,69 min (ES+) m/z 1450,55 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~10 %), 1498 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~80 %). La mezcla de reacción se diluyó con DCM (39 ml) y se lavó con H₂O (3 x 10 ml), salmuera (20 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 100 % de DCM a 96:4 v/v de DCM/MeOH) dio maleimida 9 como una espuma (80 mg, 62 % de rendimiento en 2 etapas).

30 (c) N-(3-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)prop-2-in-1-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (10)

Una solución de 95:5 v/v de TFA/H₂O (1 ml) se añadió a una muestra del compuesto 9 protegido con Boc/TJP (80 mg, 55 μmol) a 0 °C (hielo/acetona). Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, la reacción se consideró completa según se juzgó por CL/EM (Método C), pico de producto deseado a tiempo de retención 1,24 min (ES+) m/z 1046,35 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~100 %). La mezcla de reacción se mantuvo fría y se añadió gota a gota a una solución acuosa saturada enfriada de NaHCO₃ (50 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: 100 % de CHCl₃ a 96:4 v/v de CHCl₃/MeOH) dio 10 como un sólido naranja (9 mg, 16 % de rendimiento).

Ejemplo de referencia 3



5 (a) **8,8'-(((5-(4-(*tert*-butoxicarbonil)piperazin-1-il)-1,3-fenil)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-5-oxo-11-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-*tert*-butilo (11)** Una cantidad catalítica de RuPhosPd (15,8 mg, 0,019 mmol) se añadió a una mezcla del bis-éter **2c** (200 mg, 0,19 mmol), 1-Boc-piperazina (39,6 mg, 0,21 mmol), CsCO₃ (157 mg, 0,48 mmol) y RuPhos (9 mg, 0,019 mmol) en THF seco (4 ml) en un recipiente sellable secado al horno. La mezcla se desgasificó y se roció con argón 3 veces y después se calentó en un *drysyn* precalentado a 85 °C durante 2 h dejando que la presión crezca en el vial. En este punto, el análisis por CL/EM (Método C) reveló el consumo completo de material de partida y la formación de producto sustancial a tiempo de retención 1,97 min (ES+) m/z 1083,45 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~5 %). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (50 ml). Los productos orgánicos se lavaron con H₂O (2 x 25 ml) y salmuera (25 ml) antes de secarse sobre MgSO₄, se filtraron y los volátiles se retiraron a presión reducida. El material bruto se purificó por columna de cromatografía en gel de sílice (gradiente de elución: 100 % de CHCl₃ a 9:1 v/v CHCl₃/MeOH) y se aisló puro como una espuma blanca (210 mg, 91 % de rendimiento).

20 (b) **(11aS,11a'S)-8,8'-(((5-(piperazin-1-il)-1,3-fenil)bis(metilen))bis(oxi))bis(7-metoxi-2,3-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5(11aH)-ona) (12)** Una solución de 95:5 v/v TFA/H₂O (1 ml) se añadió a una muestra del compuesto **11** protegido con Boc/THP (100 mg, 0,084 mmol) a 0 °C (hielo/agua). Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, la reacción se consideró completa como se juzgó por CL/EM (Método C), pico de producto deseado a tiempo de retención 1,02 min (no se observó ionización para este compuesto). La mezcla de reacción se mantuvo fría y se añadió gota a gota a una solución acuosa saturada enfriada de NaHCO₃ (50 ml). La mezcla se extrajo con DCM (3 x 15 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto que se usó como tal en la siguiente etapa.

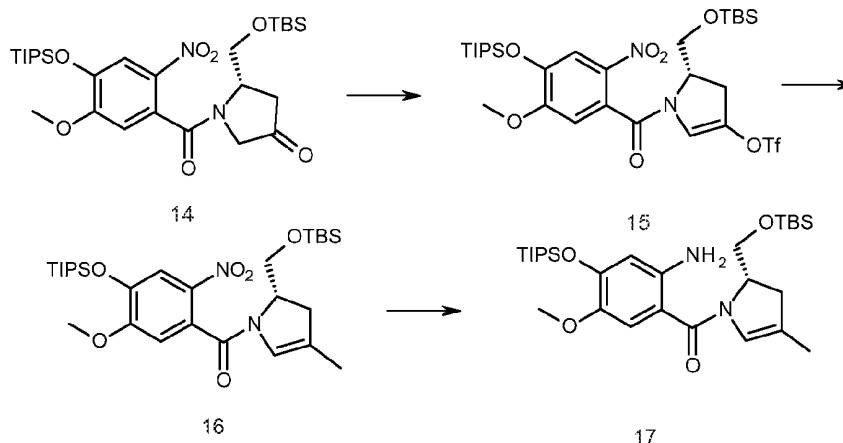
30 (c) **N-(15-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)piperazin-1-il)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (13)** Se añadió MAL-dPEG4-ácido (35 mg, 0,089 mmol) a una solución agitada de EDCI (16 mg, 0,084 mmol) y la amina primaria **12** bruta en DCM seco (3 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 3 horas en cuyo punto el análisis por CL/EM (Método C) mostró una cantidad sustancial de producto deseado a tiempo de retención 1,24 min (ES+) m/z 1077,40 ([M+H]⁺, intensidad relativa ~90 %). La mezcla de reacción se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó con H₂O (3 x 10 ml), salmuera (20 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación por UPLC preparativa (gradiente de elución: 87:13 v/v a H₂O/CH₃CH 15:75 v/v de H₂O/CH₃CN durante 11 min) dio el producto final **13** como un aceite marrón claro (4,7 mg, 5 % de rendimiento en 2 etapas).

40

Ejemplo 4

(a) (S)-(2-amino-5-metoxi-4-((trisiopropilsilil)oxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (17)

5



10

(i) trifluorometansulfonato de (S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-((trisiopropilsilil)oxi)benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-ilo (15) Se inyectó (temperatura controlada) anhídrido triflico (26 ml, 155 mmol, 3 eq) a una suspensión vigorosamente agitada de cetona 14 (30 g, 52 mmol, 1 eq) en diclorometano seco (500 ml) en presencia de 2,6-lutidina (24 ml, 207 mmol, 4 eq, secada sobre tamices) a -50 °C (baño de acetona/hielo seco). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 1 hora. Se añadió agua a la mezcla de reacción todavía fría y la capa orgánica se separó y se lavó con bicarbonato sódico saturado, salmuera y sulfato magnésico. La fase orgánica se filtró y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice, 5 % de acetato de etilo/hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y produjo el producto 15 (31,5 g, 86 %). CL/EM, método B, 4,32 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 712,89 ([M+ H]⁺; 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,71 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,05 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 4,78 (dd, J = 9,8, 5,5 Hz, 1H), 4,15 - 3,75 (m, 5H), 3,17 (ddd, J = 16,2, 10,4, 2,3 Hz, 1H), 2,99 (ddd, J = 16,3, 4,0, 1,6 Hz, 1H), 1,45 - 1,19 (m, 3H), 1,15 - 1,08 (m, 18H), 1,05 (s, 6H), 0,95 - 0,87 (m, 9H), 0,15 - 0,08 (m, 6H).

15

20

25

(ii) (S)-(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((trisiopropilsilil)oxi)fenil)metanona (16) Se añadió trifenilsarsina (1,71 g, 5,60 mmol, 0,4 eq) a una mezcla de triflato 15 (10,00 g, 14 mmol, 1 eq), ácido metilborónico (2,94 g, 49,1 mmol, 3,5 eq), óxido de plata (13 g, 56 mmol, 4 eq) y fosfato potásico tribásico (17,8 g, 84 mmol, 6 eq) en dioxano seco (80 ml) en una atmósfera de argón. La reacción se roció con argón 3 veces y se añadió cloruro de bis(benzonitrilo)paladio (II) (540 mg, 1,40 mmol, 0,1 eq). La reacción se roció con argón 3 veces más antes de calentarse instantáneamente a 110 °C. Después de 10 minutos la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; 10 % de acetato de etilo / hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida y produjo el producto 16 (4,5 g, 55 %). CL/EM, método B, 4,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 579,18 ([M+ H]⁺; 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,70 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 5,51 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 4,77 - 4,59 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 2,92 - 2,65 (m, 1H), 2,55 (d, J = 14,8 Hz, 1H), 1,62 (d, J = 1,1 Hz, 3H), 1,40 - 1,18 (m, 3H), 1,11 (s, 9H), 1,10 (s, 9H), 0,90 (s, 9H), 0,11 (d, J = 2,3 Hz, 6H).

30

35

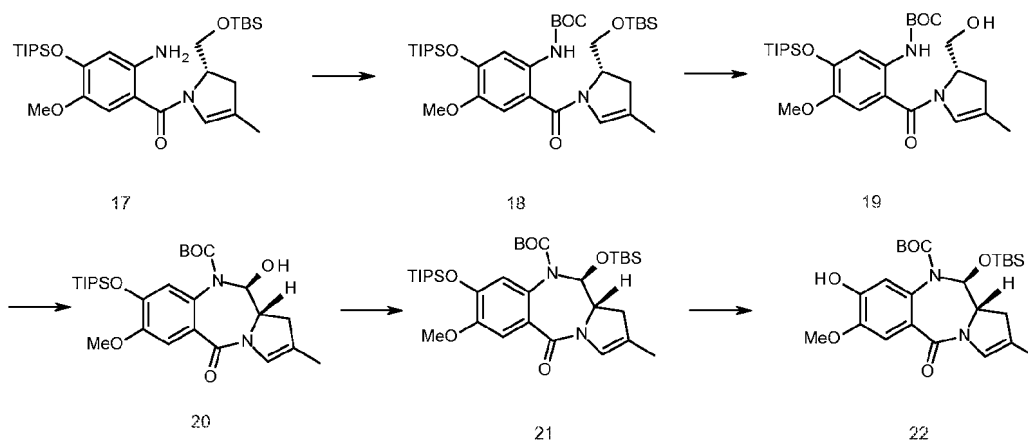
40

(iii) (S)-(2-amino-5-metoxi-4-((trisiopropilsilil)oxi)fenil)(2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (17) Se añadió zinc en polvo (5,6 g, 86 mmol, 5 eq) a una solución de compuesto 3 (10 g, 17,3 mmol) en 5 % de ácido fórmico en metanol v/v (100 ml) a aproximadamente 15 °C. Después de 30 minutos la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se diluyó con acetato de etilo y la fase orgánica se lavó con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; 10 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para producir el producto 17 (5,1 g, 80 %). CL/EM, método B, 4,23 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 550,21 ([M+ H]⁺; 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,28 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,64 - 4,53 (m, J = 4,1 Hz, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,87 (s, 1H), 3,77 - 3,69 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,71 - 2,60 (m, 1H), 2,53 - 2,43 (m, 1H), 2,04 - 1,97 (m, J = 11,9 Hz, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,26 - 1,13 (m, 3H), 1,08 - 0,99 (m, 18H), 0,82 (s, 9H), 0,03 - -0,03 (m, J = 6,2 Hz, 6H).

45

50

(b) 11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1Hbenzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-*tert*-butilo (22)



5

(i) (2-(2-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((*triisopropilsilil*)oxi)fenil)carbamato de (*S*)-*tert*-butilo (18) Se fundió dicarbonato de di-*tert*-butilo (2,8 g, 12,90 mmol, 1,2 eq) con amina 17 (5,9 g, 10,75 mmol) a 100 °C. Después de 10 minutos, se observó la conversión completa y el residuo se sometió a cromatografía en columna ultrarápida (gel de sílice; acetato de etilo al 5 % en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para proporcionar el producto 18 (6 g, 86 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,22 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,15 (s, 1H), 4,63 (s, 1H), 3,91 (s, 1H), 3,79 (s, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,71 (dd, J = 16,1, 10,2 Hz, 1H), 2,60 - 2,46 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,33 - 1,15 (m, 3H), 1,10 (s, 9H), 1,08 (s, 9H), 0,87 (s, 9H), 0,02 (s, 6H).

10

15

(ii) (2-(2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(((*triisopropilsilil*)oxi)fenil)carbamato de (*S*)-*tert*-butilo (19) Se disolvió 18 (9,87 g, 15,2 mmol) en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofuranol/agua (168:24:24:48 ml) y se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, se observó la conversión completa. El disolvente se retiró por evaporación rotativa a presión reducida. El residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con agua (2 x 500 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (200 ml) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotativa a presión reducida para proporcionar el producto deseado 19 (7,91 g, 97 %). CL/EM, método C, 2,13 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1092,45 ([M+ H]⁺; 100); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,93 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,69 (a, 1H), 4,55 (a, 1H), 3,84 - 3,76 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 2,84 (dd, J = 16,6, 10,3 Hz, 1H), 2,19 (dd, J = 16,4, 4,0 Hz, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,32 - 1,19 (m, 3H), 1,09 (s, 9H), 1,08 (s, 9H).

20

25

(iii) 11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-(((*triisopropilsilil*)oxi)-11,11a-dihidro-1Hbenzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepine-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-*tert*-butilo (20) Se añadió dimetilsulfóxido (2,3 ml, 32,2 mmol, 2,5 eq) gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (1,3 ml, 15,5 mmol, 1,2 eq) en diclorometano seco (70 ml) a -78 °C (baño de hielo seco/acetona) en una atmósfera de argón. Después de 10 minutos, se añadió lentamente una solución de 19 (6,9 g, 12,9 mmol) en diclorometano seco (50 ml) con la temperatura todavía a -78 °C. Después de 15 minutos, se añadió trietilamina (9 ml, secada sobre tamices moleculares de 4 Å, 64,5 mmol, 5 eq) gota a gota y se retiró el baño de hielo seco/acetona. La mezcla de reacción se permitió alcanzar temperatura ambiente y se extrajo con ácido clorhídrico frío (0,1 M), bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para proporcionar el producto 20 (4,36 g, 63 %). CL/EM, método C, 2,01 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1087,45 ([2M+ Na]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,17 (s, 1H), 6,70 (d, 1H), 6,65 (s, 1H), 5,74 - 5,61 (m, 1H), 4,03 (s, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,75 (td, J = 9,9, 3,3 Hz, 1H), 2,94 (dd, J = 17,1, 10,2 Hz, 1H), 2,57 (d, J = 18,5 Hz, 1H), 1,75 (d, J = 7,5 Hz, 3H), 1,37 (s, 9H), 1,30 - 1,19 (m, 3H), 1,08 (s, 9H), 1,06 (s, 9H).

30

35

40

(iv) 11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-8-(((*triisopropilsilil*)oxi)-11,11a-dihidro-1Hbenzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-*tert*-butilo (21)

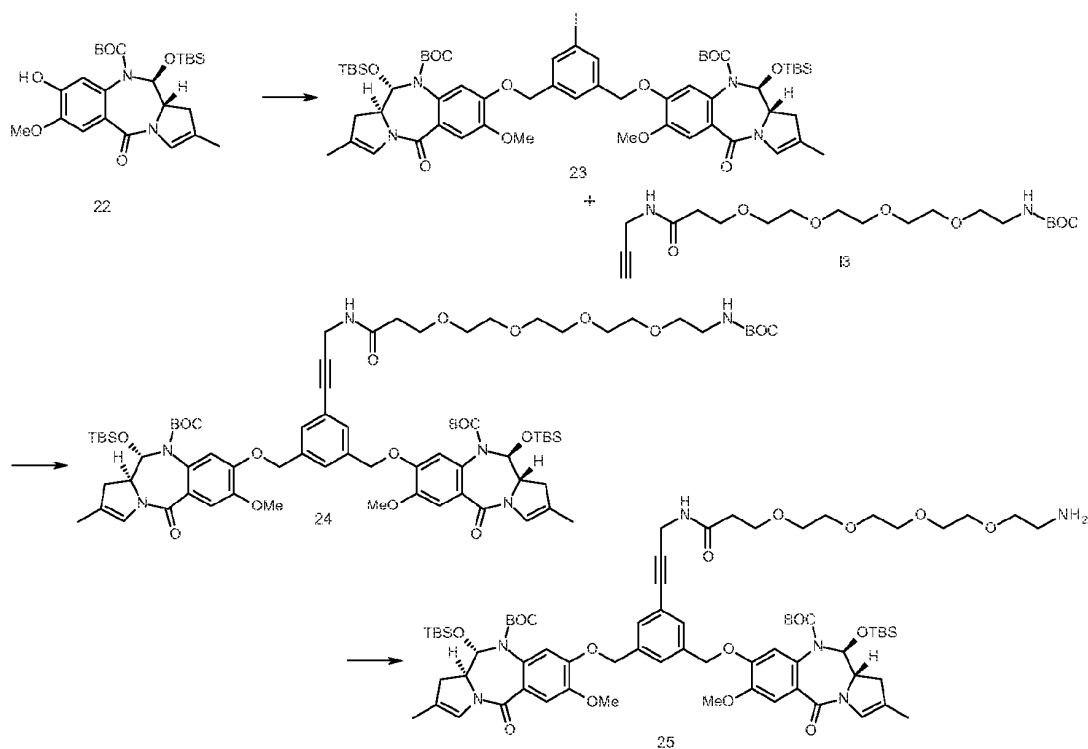
Se añadió *tert*-butildimetilsililtriflato (6,5 ml, 28,39 mmol, 3 eq) a una solución de compuesto 20 (5,04 g, 9,46 mmol) y 2,6-lutidina (4,4 ml, 37,86 mmol, 4 eq) en diclorometano seco (60 ml) a 0 °C en argón. Después de 10 minutos el baño frío se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se extrajo con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 21 (5,18 g, 85 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,17 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 5,79 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,65 (td, J = 9,9, 3,8 Hz, 1H), 2,89 (dd, J = 16,9, 10,3 Hz, 1H), 2,35 (d, J =

50

16,7 Hz, 1H), 1,75 (s, 3H), 1,31 (s, 9H), 1,28 - 1,18 (m, 3H), 1,09 (s, 9H), 1,08 (s, 9H), 0,85 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

(v) 11-((*terc-butildimetilsilil*)oxi)-8-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-*terc*-butilo (22) Se añadió acetato de litio (800 mg, 7,73 mmol) a una solución de compuesto 21 (5 g, 7,73 mmol) en dimetilformamida húmeda (50 ml, 50:1 DMF/agua). Después de 2 horas, la reacción se completó y la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (250 ml) y se lavó con solución de ácido cítrico acuosa (pH ~ 3), agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 25 % a 50 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron, se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 22 (3,14 g, 83 %). CL/EM, método C, 1,92 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 491,25 ([M+ H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,20 (s, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,08 (s, 1H), 5,81 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,71 (td, J = 9,8, 3,8 Hz, 1H), 2,89 (dd, J = 16,9, 10,3 Hz, 1H), 2,36 (d, J = 16,9 Hz, 1H), 1,75 (s, 3H), 1,31 (s, 9H), 0,85 (s, 9H), 0,23 (s, 3H), 0,21 (s, 3H).

(c) 8,8'-(((5-(1-amino-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azonadec-18-in-19-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepine-10(5H)-carboxilato) de (11*S*,11a*S*,11'*S*,11a'*S*)-*di-terc*-butilo (25)



(i) 8,8'-(((5-yodo-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((*terc*butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11*S*,11a*S*,11'*S*,11a'*S*)-*di-terc*-butilo (23) Se añadió 1,3-bis(bromometil)-5-yodobenceno (400 mg, 1,02 mmol) a una solución agitada de 22 (1 g, 2,04 mmol, 2 eq), TBAI (38 mg, 0,102 mmol, 1 eq) y K₂CO₃ (282 mg, 2,04 mmol, 2 eq) en DMF seco (10 mol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 2 horas en cuyo punto el análisis por TLC mostró conversión completa. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el DMF se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se diluyó en EtOAc y se lavó con agua, salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 50 % a 80 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 22 (1,27 g, cuant.). CL/EM, método C, 2,38 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1232,35 ([M+ Na]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,75 (s, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,24 (s, 2H), 6,67 (s, 2H), 6,51 (s, 2H), 5,78 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,03 (dd, J = 34,2, 12,8 Hz, 4H), 3,93 (s, 6H), 3,68 (td, J = 9,8, 3,7 Hz, 2H), 2,89 (dd, J = 16,9, 10,3 Hz, 2H), 2,34 (d, J = 17,0 Hz, 2H), 1,75 (s, 6H), 1,22 (d, J = 8,5 Hz, 16H), 0,84 (s, 18H), 0,22 (s, 6H), 0,16 (s, 6H).

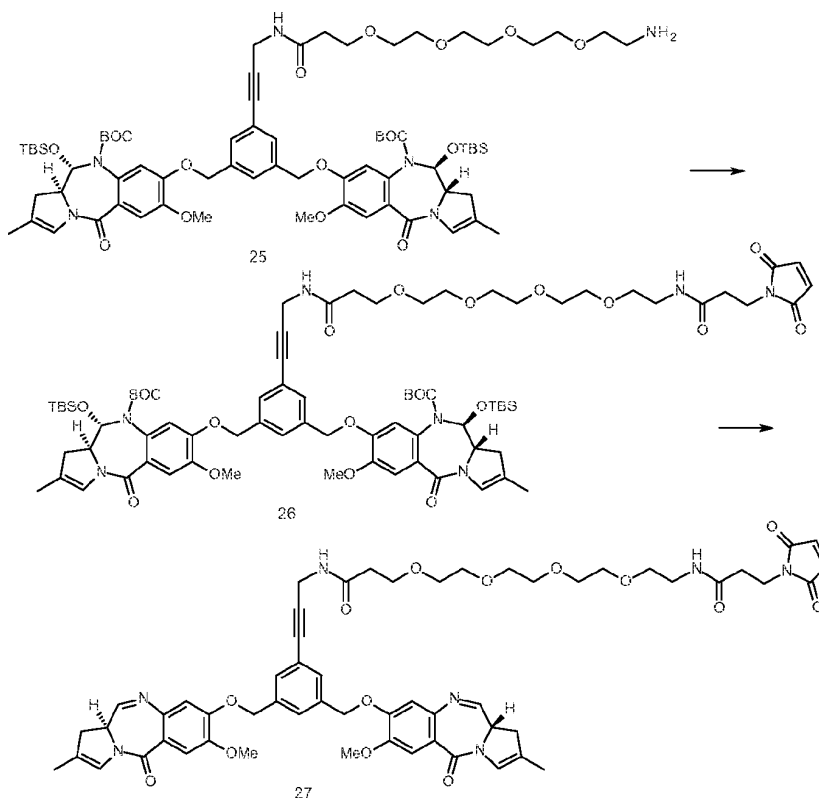
(ii) 8,8'-(((5-(2,2-dimetil-4,20-dioxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5,21-diazatetracos-23-in-24-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11S, 11a'S)-di-terc-butilo (24)

Una cantidad catalítica de Pd(PPh₃)₄ (22,8 mg, 19,9 μmol, 0,02 eq) se añadió a una mezcla de 23 (1,2 g, 0,995 mmol, 1 eq), I3 (400 mg, 0,995 mmol, 1 eq), CuI (7,6 mg, 39,6 μmol, 0,4 eq), dietilamina (0,20 ml, 1,99 mmol, 2 eq) y gránulos de tamiz molecular de 4 Å secados al horno en DMF seco (1 ml). La mezcla se desgasificó y se roció con argón 3 veces, después se calentó en un microondas a 100 °C durante 10 minutos. El DMF se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; 5 % de metanol en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 24 (1,17 g, 79 %). CL/EM, Método D, (2,43 min (ES+) m/z (intensidad relativa) sin ionización; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,49 (s, 1H), 7,47 (s, 2H), 7,24 (s, 2H), 6,68 (s, 2H), 6,56 (s, 2H), 5,79 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 5,04 (dd, J = 28,9, 12,3 Hz, 4H), 4,25 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 3,93 (s, 6H), 3,79 - 3,56 (m, 16H), 3,52 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,29 (d, J = 5,0 Hz, 2H), 2,97 - 2,83 (m, 2H), 2,51 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,35 (d, J = 16,1 Hz, 2H), 1,76 (s, 6H), 1,43 (s, 9H), 1,22 (s, 18H), 0,85 (s, 18H), 0,22 (s, 6H), 0,17 (s, 6H).

(iii) 8,8'-(((5-(1-amino-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azonadec-18-in-19-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1Hbenzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo (25)

Se añadió terc-butildimetilsililtriflato (0,77 ml, 3,37 mmol, 10 eq) a una solución de compuesto 24 (500 g, 0,337 mmol) y 2,6-lutidina (0,51 ml, 4,38 mmol, 12 eq) en diclorometano seco (10 ml). La reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con cloruro amónico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el intermedio carbamato TBS. El residuo se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se añadió una mezcla de fluoruro de tetra-n-butilamonio (1 M, 1,7 ml, 1,685 mmol, 5 eq) y ácido acético (0,1 ml, 1,685 mmol, 5 eq). La mezcla de reacción se agitó 3 horas a temperatura ambiente; después se lavó con agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el disolvente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar 25 en bruto. CL/EM, Método D, (1,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1155,30. ([M+H]⁺).

(d) N-(3-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)prop-2-in-1-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida 27 [SG3376]



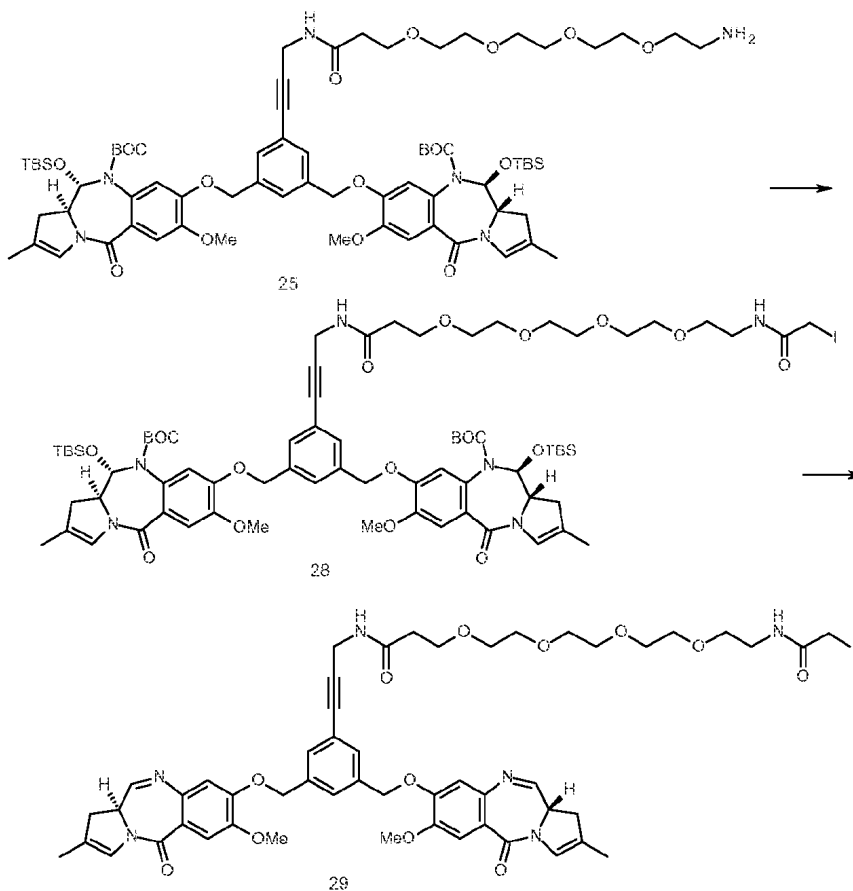
(i) 8,8'-(((5-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,19-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-4,20-diazatricos-22-in-23-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo 26

Se añadió EDCI (65 mg, 0,34 mmol, 1 eq) a una solución de 25 bruto (0,34 mmol, 1 eq) y ácido 3-maleimidopropiónico (57,5 mg, 0,34 mmol, 1 eq) en diclorometano (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas después de lo que se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 26 en bruto. CL/EM, Método D, (1,49 min (ES+) m/z (intensidad relativa) sin ionización).

(ii) *N*-(3-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)prop-2-in-1-il)-1-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida 27

Se añadió ácido trifluoroacético (9,5 ml) a una mezcla de 26 bruto (0,337 mmol) en agua (0,5 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 2 horas a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío. La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente; metanol 2 al 5 % en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el diluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 27 (70,4 mg, 20 %). CL/EM, Método E (4,96 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1070,25. ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,78 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 7,52 (s, 2H), 7,44 (s, 2H), 7,40 (s, 1H), 7,02 - 6,93 (m, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,77 (s, 2H), 6,74 (s, 2H), 6,65 (s, 2H), 5,22 - 5,01 (m, 4H), 4,31 - 4,15 (m, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,89 - 3,72 (m, 4H), 3,65 - 3,54 (m, 10H), 3,54 - 3,45 (m, 4H), 3,43 - 3,34 (m, 2H), 3,25 - 3,12 (m, 2H), 2,94 (dd, J = 27,0, 10,2 Hz, 2H), 2,51 (dd, J = 13,6, 6,7 Hz, 4H), 1,83 (s, 6H).

(e) *N*-(3-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)prop-2-in-1-il)-1-(2-iodoacetamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida 29 [SG3378]



(i) 8,8'-(((5-(1-iodo-2,18-dioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19-diazadocos-21-in-22-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo 28

Se añadió anhídrido yodoacético (53 mg, 0,150 mmol, 1 eq) a una solución de 25 bruto (0,150 mmol, 1 eq) en diclorometano (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos después de lo cual se

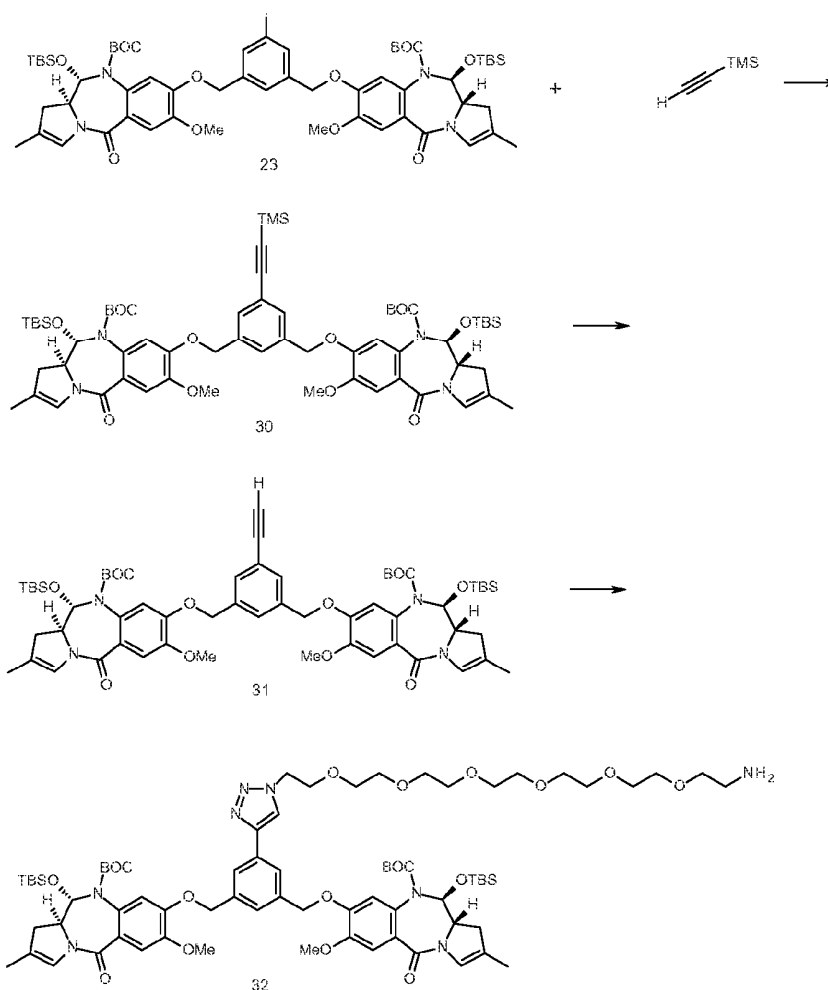
observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 28 en bruto. CL/EM, Método D, (1,50 min (ES+) m/z (intensidad relativa) sin ionización).

(ii) *N*-(3-(3,5-bis(((*S*)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1*H*-benzo[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)prop-2-*in*-1-il)-1-(2-iodoacetamido)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida 29

Se añadió ácido trifluoroacético (0,45 ml) a una mezcla de 28 bruto (0,337 mmol) en agua (0,05 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 30 minutos a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío. La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente; metanol 2 al 5 % en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 29 (4,23 mg, 5 %). CL/EM, Método D, (1,35 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1087,20 ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 7,53 (s, 2H), 7,45 (s, 3H), 7,07 (a, 1H), 6,94 (a, 1H), 6,78 (s, 2H), 6,73 (s, 2H), 5,15 (q, J = 12,6 Hz, 4H), 4,32 - 4,19 (m, 4H), 3,96 (s, 6H), 3,76 (dd, J = 12,0, 6,4 Hz, 2H), 3,69 (s, 2H), 3,64 (d, J = 3,6 Hz, 8H), 3,60 (s, 4H), 3,55 - 3,49 (m, 2H), 3,42 (dd, J = 10,3, 5,2 Hz, 2H), 3,23 - 3,11 (m, 2H), 3,00 - 2,89 (m, 2H), 2,53 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 1,83 (s, 6H).

Ejemplo 5

(a) *8,8'*-(((5-(1-(20-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1*H*-benzo[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10(5*H*)-carboxilato) de (1*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-*di-tert*-butilo 32



(i) *8,8'*-(((5-((trimetilsilil)etnil)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1*H*-benzo[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10(5*H*)-carboxilato) de (1*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-*di-tert*-butilo 30

Una cantidad catalítica de Pd(PPh₃)₄ (11 mg, 0,01 mmol, 0,02 eq) se añadió a una mezcla de 23 (600 mg,

0,496 mmol), TMS-acetileno (0,21 ml, 1,488 mmol, 3 eq), CuI (4,0 mg, 0,02 mmol, 0,04 eq), dietilamina (0,1 ml, 0,992 mmol, 2 eq) y gránulos de tamiz molecular de 4 Å secados al horno en DMF seco (4 ml). La mezcla se desgasificó y se roció con argón 3 veces, después se calentó en un microondas a 100 °C durante 10 minutos. El DMF se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico filtrado y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; 50 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 30 (530 mg, 91 %). CL/EM, Método C (2,45 min (ES+); sin ionización); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,52 (s, 1H), 7,49 (s, 2H), 7,23 (s, 2H), 6,67 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 5,78 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,06 (dd, J = 41,6, 12,8 Hz, 4H), 3,93 (s, 6H), 3,68 (td, J = 9,8, 3,7 Hz, 2H), 2,90 (dd, J = 17,0, 10,4 Hz, 2H), 2,35 (d, J = 17,0 Hz, 2H), 1,76 (s, 6H), 1,20 (s, 18H), 0,84 (s, 18H), 0,22 (s, 15H), 0,17 (s, 6H).

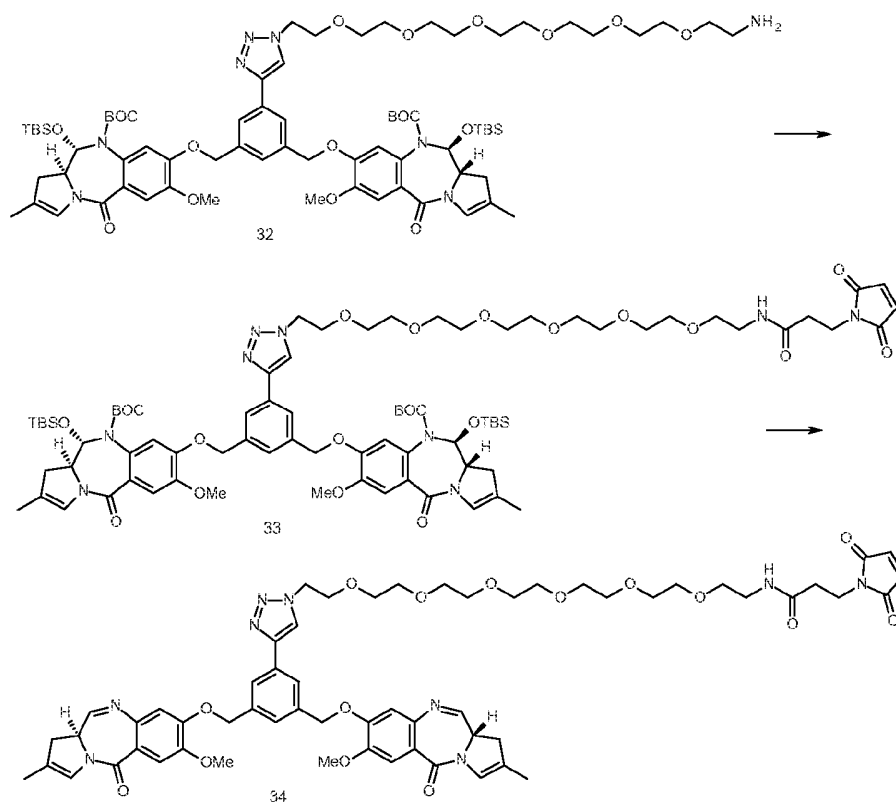
(ii) 8,8'-(((5-*etinil*-1,3-*fenilen*)bis(*metilen*))bis(*oxi*))bis(11-((*terc*butildimetilsilil)oxi)-7-*metoxi*-2-*metil*-5-*oxo*-11,11*a*-*dihidro*-1*H*-*benzo*[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10(5*H*)-*carboxilato*) de (11*S*,11*aS*,11'*S*,11*a*'*S*)-*di-terc*-butilo 31

Se añadió K₂CO₃ sólido (124 mg, 0,90 mmol, 2 eq) a una solución agitada del compuesto 30 protegido con TMS (530 mg, 0,449 mmol) en MeOH (10 ml). Después de 1 hora agitando a temperatura ambiente la reacción se completó. El metanol se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 31 (477 mg, 95 %). CL/EM, Método C (2,31 min (ES+); sin ionización); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (s, 3H), 7,24 (s, 2H), 6,68 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 5,79 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 5,07 (dd, J = 33,2, 12,8 Hz, 4H), 3,93 (s, 6H), 3,69 (td, J = 9,7, 3,6 Hz, 2H), 3,08 (s, 1H), 2,90 (dd, J = 16,9, 10,3 Hz, 2H), 2,35 (d, J = 16,8 Hz, 2H), 1,76 (s, 6H), 1,25 - 1,13 (m, 18H), 0,85 (s, 18H), 0,22 (s, 6H), 0,16 (m, 6H).

(iii) 8,8'-(((5-(1-(20-*amino*-3,6,9,12,15,18-*hexaoxaicosil*)-1*H*-1,2,3-*triazol*-4-*il*))-1,3-*fenilen*)bis(*metilen*))bis(*oxi*))bis(11-((*terc*butildimetilsilil)oxi)-7-*metoxi*-2-*metil*-5-*oxo*-11,11*a*-*dihidro*-1*H*-*benzo*[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-10(5*H*)-*carboxilato*) de (11*S*,11*aS*,11'*S*,11*a*'*S*)-*di-terc*-butilo 32

Se añadieron CuSO₄·5H₂O sólido (5 mg, 0,021 mmol, 0,05 eq) y *L*-ascorbato (+)-sódico (17,0 mg, 0,086 mmol, 0,2 eq) a una solución agitada de 20-*azido*-3,6,9,12,15,18-*hexaoxaicosan*-1-*amina* (151 mg, 0,43 mmol, 1 eq) y el alquino 31 (477 mg, 0,43 mmol, 1 eq) en *terc*-BuOH (5 ml) y H₂O (5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se desgasificó y se roció con argón. Después de agitar durante 2 horas, la reacción se completó. La mezcla de reacción se diluyó en acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 32 (640 mg, cuant.). CL/EM, Método C, (1,67 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1457,35 ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (s, 1H), 7,93 (a, 3H), 7,54 (s, 1H), 7,25 (s, 2H), 6,68 (s, 2H), 6,62 (s, 2H), 5,79 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,14 (dd, J = 30,6, 11,8 Hz, 4H), 4,68 - 4,59 (m, 2H), 4,00 - 3,94 (m, 2H), 3,94 (s, 6H), 3,75 - 3,47 (m, 24H), 2,91 (dd, J = 16,9, 10,3 Hz, 2H), 2,35 (d, J = 16,7 Hz, 2H), 1,76 (s, 6H), 1,31 - 1,11 (m, 18H), 0,85 (d, J = 8,1 Hz, 18H), 0,20 (s, 6H), 0,16 (s, 6H).

(b) *N*-(20-(4-(3,5-*bis*((*S*)-7-*metoxi*-2-*metil*-5-*oxo*-5,11*a*-*dihidro*-1*H*-*benzo*[*e*]pirrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-8-*il*)oxi)*metil*)*fenil*)-1*H*-1,2,3-*triazol*-1-*il*)-3,6,9,12,15,18-*hexaoxaicosil*)-3-(2,5-*dioxo*-2,5-*dihidro*-1*H*-*pirrol*-1-*il*)*propanamida* (34) [SG3387]



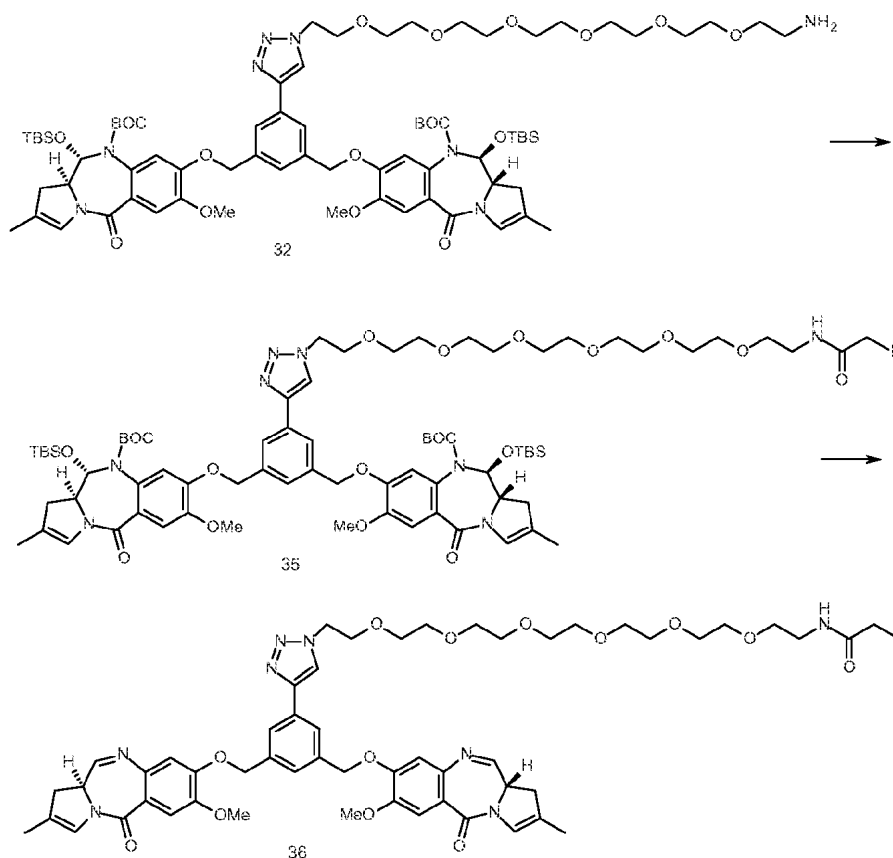
(i) 8,8'-(((5-(1-(24-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azatetracosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo 33

Se añadió EDCI (40 mg, 0,21 mmol, 1 eq) a una solución de 32 (300 mg, 0,206 mmol, 1 eq) y ácido 3-maleimidopropiónico (35 mg, 0,21 mmol, 1 eq) en diclorometano (10 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas después de lo que se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 33 en bruto (320 mg, cuant.). CL/EM, Método C, (2,13 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1609,55 ([M+H]⁺).

(ii) N-(20-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida 34

Se añadió ácido trifluoroacético (19 ml) a una mezcla de 33 bruto (0,186 mmol) en agua (1 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 30 minutos a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío (~2 l). La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (~1 l). La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente; metanol 2 al 5 % en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el diluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 34 (56 mg, 26 %). CL/EM, Método E (4,99 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1144,35. ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s, 1H), 7,86 (s, 2H), 7,75 (d, J = 3,9 Hz, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,48 (s, 1H), 6,81 (s, 2H), 6,71 (s, 2H), 6,65 (s, 2H), 6,39 (a, 1H), 5,21 (q, J = 12,4 Hz, 4H), 4,58 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 4,25 - 4,17 (m, 2H), 3,96 - 3,87 (m, 8H), 3,85 - 3,77 (m, 2H), 3,65 - 3,43 (m, 22H), 3,37 (dd, J = 9,9, 4,8 Hz, 2H), 3,20 - 3,08 (m, 2H), 2,92 (dd, J = 16,9, 4,6 Hz, 2H), 2,49 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,81 (s, 6H).

(c) N-(20-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-iodoacetamida 36 [SG3389]



(i) 8,8'-(((5-(1-(1-iodo-2-oxo-6,9,12,15,18,21-hexaoxa-3-azatricosan-23-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenil)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de (11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo 35

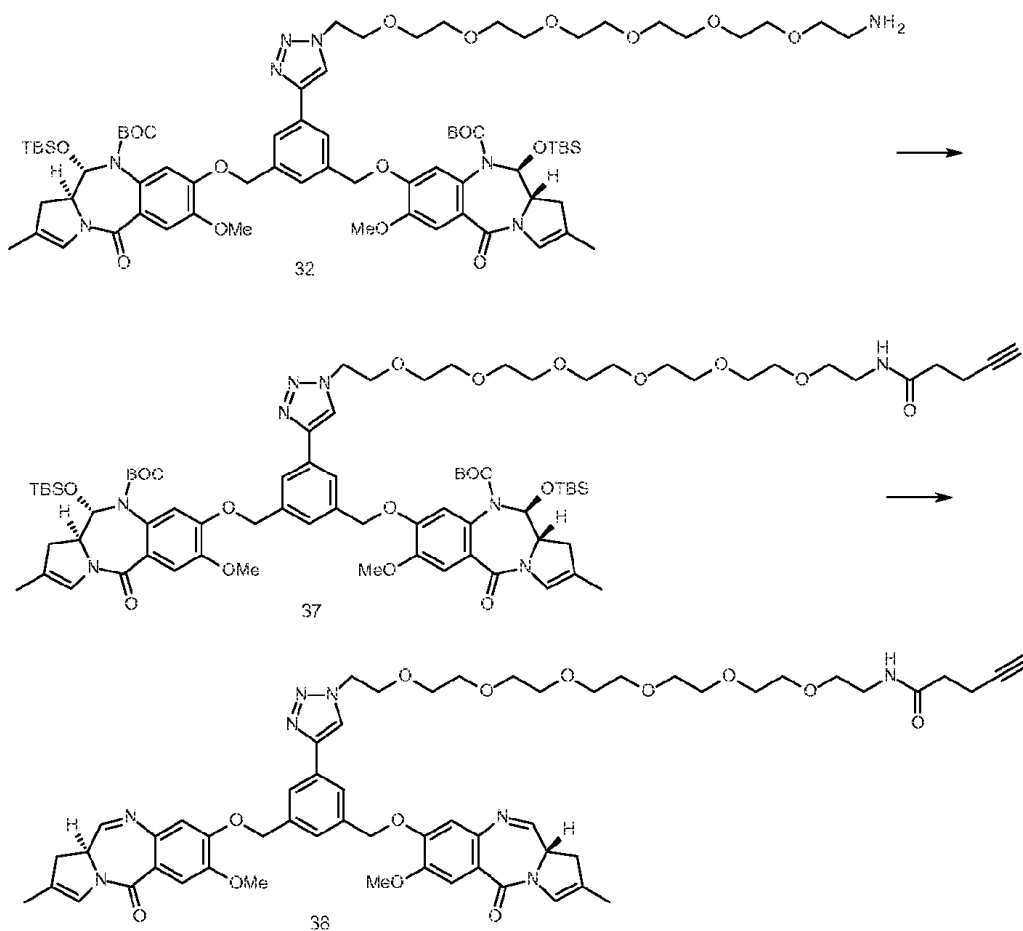
Se añadió anhídrido yodoacético (37 mg, 0,103 mmol, 1 eq) a una solución de 32 (150 mg, 0,103 mmol, 1 eq) en diclorometano (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos después de lo cual se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 35 en bruto. CL/EM, Método C, (2,17 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1625,35 ([M+H]⁺)).

(ii) N-(20-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-s][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-iodoacetamida 36

Se añadió ácido trifluoroacético (4,95 ml) a una mezcla de 35 bruto (0,103 mmol) en agua (0,05 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 30 minutos a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío (200 ml). La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente; metanol 2 al 10 % en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el diluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 36 (32 mg, 27 %). CL/EM, Método E (5,16 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1161,10. ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,03 (s, 1H), 7,87 (s, 2H), 7,76 (d, J = 3,9 Hz, 2H), 7,51 (s, 2H), 7,48 (s, 1H), 6,95 (a, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,72 (s, 2H), 5,21 (q, J = 12,4 Hz, 4H), 4,59 - 4,58 (m, 2H), 4,24 - 4,20 (m, 2H), 3,96 - 3,87 (m, 8H), 3,70 (s, 2H), 3,66 - 3,47 (m, 22H), 3,41 (dd, J = 10,3, 5,2 Hz, 2H), 3,19 - 3,07 (m, 2H), 2,98 - 2,85 (m, 2H), 1,78 (d, J = 22,4 Hz, 6H).

Ejemplo 6

N-(20-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)pent-4-inamida (38)



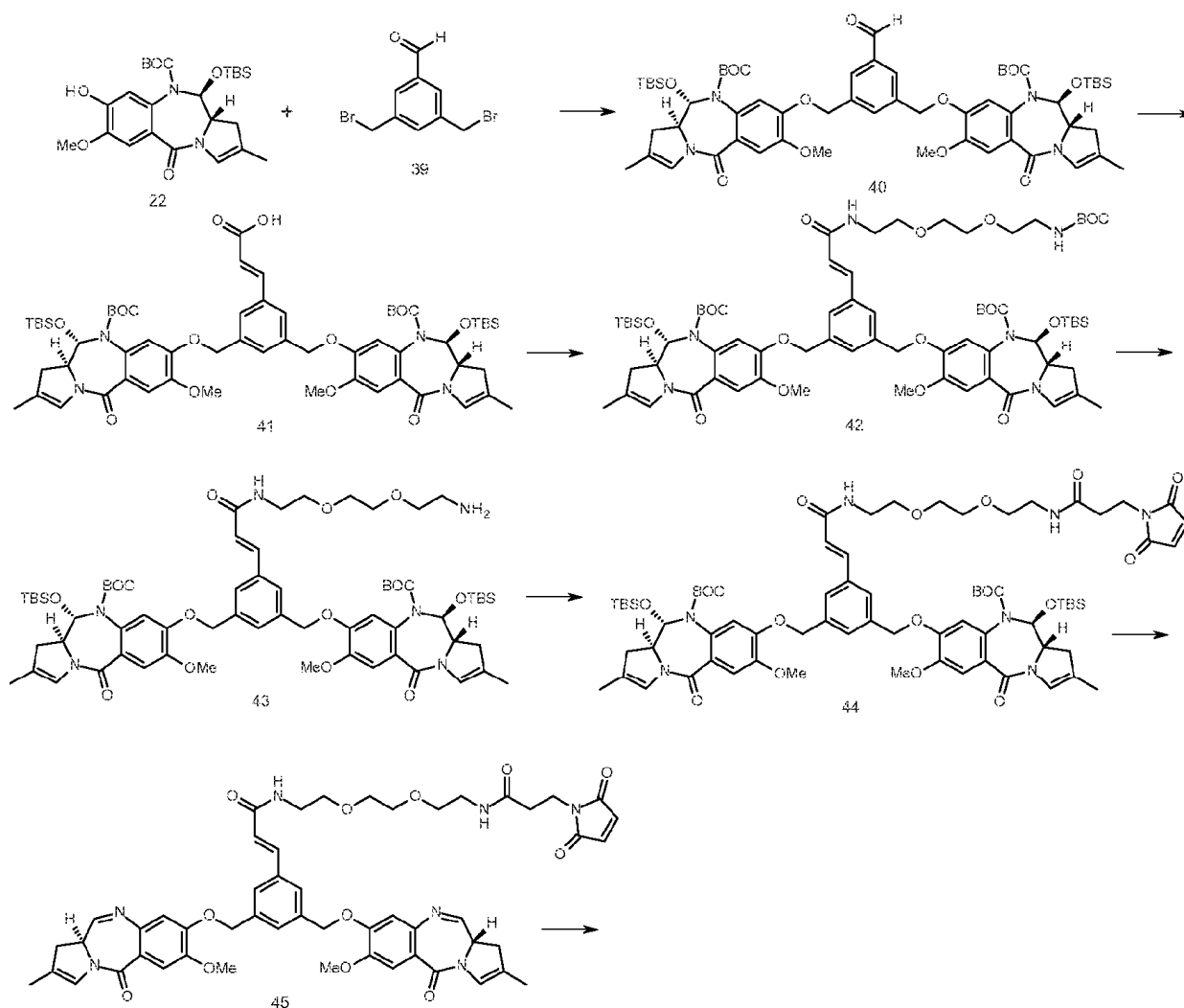
(i) 8,8'-(((5-(1-(22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azahexacos-25-in-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de 11S,11aS,11'S,11a'S)-di-terc-butilo 37

Se añadió EDCI (20 mg, 0,103 mmol, 1 eq) a una solución de 32 (150 mg, 0,103 mmol, 1 eq) y ácido pent-4-inoico (20 mg, 0,103 mmol, 1 eq) en diclorometano (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas después de lo que se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 37 en bruto. CL/EM, Método C, (2,16 min (ES+) m/z (intensidad relativa) sin ionización).

(ii) N-(20-(4-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)pent-4-inamida 38

Se añadió ácido trifluoroacético (4,95 ml) a una mezcla de 37 bruto (0,103 mmol) en agua (0,05 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 30 minutos a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío (200 ml). La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente; metanol 2 al 10 % en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el diluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 38 (40 mg, 36 %). CL/EM, Método E (5,11 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1073,30. ([M+H]⁺); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s, 1H), 7,87 (s, 2H), 7,77 (d, J = 3,8 Hz, 2H), 7,52 (s, 2H), 7,49 (s, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,72 (s, 2H), 6,42 (s, 1H), 5,22 (q, J = 12,3 Hz, 4H), 4,59 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 4,28 - 4,17 (m, 2H), 3,99 - 3,88 (m, 8H), 3,57 (dt, J = 9,5, 8,0 Hz, 22H), 3,50 - 3,39 (m, 2H), 3,20 - 3,07 (m, 2H), 2,93 (dd, J = 16,7, 3,9 Hz, 2H), 2,51 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,39 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,01 (dd, J = 11,6, 5,4 Hz, 1H), 1,82 (s, 6H).

Ejemplo 7



5 (i) **8,8'-(((5-formil-1,3-fenilen)bis(metilen))bis(oxi))(11S,11aS,11'S,11'a'S)-bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de di-terc-butilo 40**
 Se añadió 3,5-bis(bromometil)benzaldehído 39 (30 mg, 0,102 mmol) a una solución agitada de 22 (100 mg, 0,204 mmol, 2 eq), TBAI (7 mg, 0,02 mmol, 0,1 eq) y K_2CO_3 (28 mg, 0,204 mmol, 2 eq) en DMF seco (2 mol). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 4 horas y 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó en EtOAc y se lavó con agua, salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 50 % a 70 % de acetato de etilo en hexano). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 40 (90 mg, 79 %). CL/EM, método C (2,27 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1111,35 ($[M+Na]^+$); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,05 (s, 1H), 7,95 (s, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,26 (s, 2H), 6,69 (s, 2H), 6,58 (s, 2H), 5,80 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,17 (s, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,72 - 3,68 (m, 2H), 2,91 (dd, J = 16,7, 10,3 Hz, 2H), 2,36 (d, J = 17,4 Hz, 2H), 1,77 (s, 6H), 1,25 (s, 18H), 0,84 (s, 18H), 0,22 (s, 6H), 0,15 (s, 6H).

20 (ii) **ácido (E)-3-(3,5-bis(((11S,11aS)-10-(terc-butoxicarbonil)-11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)acrílico 41**
 Ácido malónico (14 mg, 0,138 mmol, 2,2 eq) y compuesto 40 se disolvieron en una mezcla de piperidina (1 μ l) y piridina (0,1 ml). La mezcla de reacción se calentó a 95 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 2 horas. La mezcla se diluyó en EtOAc y se lavó con agua, salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el acetato de etilo en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; gradiente, 50 % a 100 % de acetato de etilo en hexano seguido de MeOH al 2 % en EtOAc). Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el eluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 41 (50 mg, 53 %). CL/EM, método C (2,21 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1153,35 ($[M+Na]^+$); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ

7,73 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 7,58 (s, 2H), 7,55 (s, 1H), 7,26 (s, 2H), 6,68 (s, 2H), 6,54 (s, 2H), 6,46 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,77 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,11 (dd, J = 27,4, 12,3 Hz, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,68 (dd, J = 8,9, 6,4 Hz, 2H), 2,89 (dd, J = 16,8, 10,3 Hz, 2H), 2,34 (d, J = 16,7 Hz, 2H), 1,75 (s, 6H), 1,29 - 1,09 (m, 18H), 0,82 (s, 18H), 0,21 (s, 6H), 0,13 (s, 6H).

5 (iii) 8,8'-(((5-((E)-2,2-dimetil-4,15-dioxo-3,8,11-trioxa-5,14-diazaheptadec-16-en-17-il)-1,3-fenileno)bis(metileno))bis(oxi))(11S,11aS,11'S,11a'S)-bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de di-terc-butilo 42

10 Se añadió EDCI (9 mg, 0,045 mmol, 1 eq) a una solución de 41 (50 mg, 0,043 mmol, 1 eq) y (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo (11 mg, 0,045 mmol, 1 eq) en diclorometano (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora después de lo que se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 42 en bruto. CL/EM, Método C, (2,29 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1384,35 ([M+ Na]⁺)).

20 (iv) 8,8'-(((5-((E)-3-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)amino)-3-oxoprop-1-en-1-il)-1,3-fenileno)bis(metileno))bis(oxi))(11S,11aS,11'S,11a'S)-bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de di-terc-butilo 44

25 Se añadió terc-butildimetilsililtrifilato (0,10 ml, 0,43 mmol, 10 eq) a una solución de compuesto 42 (0,043 mmol) y 2,6-lutidina (0,10 ml, 0,56 mmol, 13 eq) en diclorometano seco (2 ml). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con cloruro amónico acuoso saturado, agua y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar una mezcla de amina 43 y compuesto mono desprotegido con TBS en bruto. CL/EM, Método C, (1,72 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1283,35 ([M+ Na]⁺)).

30 (v) 8,8'-(((5-((E)-16-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,14-dioxo-7,10-dioxa-4,13-diazahexadec-1-en-1-il)-1,3-fenileno)bis(metileno))bis(oxi))(11S,11aS,11'S,11a'S)-bis(11-((terc-butildimetilsilil)oxi)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato) de di-terc-butilo 44

35 Se añadió EDCI (9 mg, 0,045 mmol, 1 eq) a una solución de 43 (0,043 mmol, 1 eq) y ácido 3-maleimidopropiónico (8 mg, 0,045 mmol, 1 eq) en diclorometano (2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas después de lo que se observó la conversión completa por CLEM. La mezcla de reacción se diluyó en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar compuesto 44 en bruto. CL/EM, Método C, (2,19 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1435,40 ([M+ Na]⁺)).

40 (vi) (E)-3-(3,5-bis(((S)-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)metil)fenil)-N-(2-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etoxi)etoxi)etil)acrilamida 45

45 Se añadió ácido trifluoroacético (4,95 ml) a una mezcla de 44 bruto (0,043 mmol) en agua (0,05 ml) a 0 °C. La reacción se agitó 30 minutos a 0 °C. Después la mezcla de reacción se añadió gota a gota en bicarbonato sódico acuoso saturado frío (100 ml). La mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó después con salmuera, se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y el diclorometano en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante se sometió a HPLC preparativa. Las fracciones puras se recogieron y se combinaron y el diluyente en exceso se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida para dar el producto 45 (4,26 mg, 10 %). CL/EM, Método C (1,35 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 968,25. ([M+H]⁺)).

Ejemplo 8

50 Procedimiento general de conjugación de anticuerpos

Se diluyen anticuerpos a 1-5 mg/ml en un tampón de reducción (ejemplos: solución salina tamponada con fosfato PBS, tampón histidina, tampón borato de sodio, tampón Tris). Se añade una solución recientemente preparada de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxi)etil)fosfina para reducir selectivamente los puentes de disulfuro de cisteína. La cantidad de TCEP es proporcional al nivel objetivo de reducción, dentro de 1 a 4 equivalentes molares por anticuerpo, que generan 2 a 8 tioles reactivos. Después de la reducción durante varias horas a 37 °C, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y el exceso de fármaco-enlazador (**7**, **10**) se añade como una solución de DMSO diluida (contenido de DMSO final de hasta el 10 % en volumen/volumen de mezcla de reacción). La mezcla se agita suavemente a tanto 4 °C como a temperatura ambiente durante el tiempo apropiado, generalmente 1-3 horas. El exceso de tioles reactivos puede hacerse reaccionar con un 'reactivo de encapuchado de tiol' como N-etilmaleimida (NEM) al final de la conjugación. Los conjugados de anticuerpo-fármaco se concentran usando filtros de concentración centrífuga con un corte de peso molecular de 10 kDa o superior, a continuación se purifican por filtración de flujo tangencial (TFF) o cromatografía de líquidos rápida de proteínas (FPLC). Los de conjugados de anticuerpo-fármaco correspondientes pueden determinarse por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de líquidos de resolución ultra-alta (UHPLC) para evaluar la relación de fármaco por anticuerpo (DAR) usando cromatografía de fase inversa (RP) o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC),

acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas; el nivel de agregados y la pureza de los monómeros puede analizarse por HPLC o UHPLC usando cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas. La concentración de conjugado final se determina por una combinación de ensayo espectroscópico (absorbancia a 280, 214 y 330 nm) y bioquímico (ensayo con ácido bicinconínico BCA; Smith, P.K., y col. (1985) *Anal. Biochem.* **150** (1): 76-85; usando un anticuerpo IgG de concentración conocida como referencia). Los conjugados de anticuerpo-fármaco se esterilizan generalmente por filtración usando filtros de 0,2 µm bajo condiciones asépticas, y se guardan a +4 °C, -20 °C o -80 °C.

Ejemplos y ejemplos de referencia de conjugaciones particulares se describen a continuación.

Conjugado de referencia A (Ab-7, ConjA)

Se diluyó Anticuerpo (Ab) (2,0 mg, 13,3 nanomoles) en 1,8 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (2 equivalentes molares/anticuerpo, 26,6 nanomoles, 2,66 µl) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 2,3 horas en un bloque térmico. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **7** como una solución de DMSO (3,5 equivalentes molares/anticuerpo, 46,7 nanomoles, en 0,2 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente, a continuación, la conjugación se interrumpe mediante la adición de N-etil maleimida (1 micromol, 10 µl a 100 mM) seguido 15 minutos después por N-acetil cisteína (1,5 micromoles, 15 µl a 100 mM), a continuación se inyecta en una FPLC AKTA™ usando una columna XK16/70 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con 1,5 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjA se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración. El ensayo de BCA proporciona una concentración de ConjA final a 1,25 mg/ml en 1,4 ml, y la masa obtenida de ConjA es 1,75 mg (87 % de rendimiento).

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjA a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **7**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **7**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,8 moléculas del compuesto **7** por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Waters Acquity UPLC BEH200 SEC 1,7 µm 4,6 x 150 mm eluyendo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración que contiene un 5 % de isopropanol (v/v) sobre una muestra de ConjA a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas.

Conjugado de referencia B (Ab-10, ConjB)

Se diluyó Anticuerpo (Ab) (2,0 mg, 13,3 nanomoles) en 1,8 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (2 equivalentes molares/anticuerpo, 26,6 nanomoles, 2,66 µl) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,5 horas en un bloque térmico. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **10** como una solución de DMSO (3,5 equivalentes molares/anticuerpo, 46,7 nanomoles, en 0,2 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente, a continuación, la conjugación se interrumpe mediante la adición de N-etil maleimida (1 micromol, 10 µl a 100 mM) seguido 15 minutos a continuación por N-acetil cisteína (1,5 micromoles 15 µl a 100 mM), a continuación se inyecta en una FPLC AKTA™ usando una columna XK16/70 de GE Healthcare rellena con Superdex™ 200 PG, eluyendo con 1,5 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjB se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración. El ensayo de BCA proporciona una concentración de ConjA2 final a 0,99 mg/ml en 1,4 ml, y la masa obtenida de ConjB es 1,39 mg (70 % de rendimiento).

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjB a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **10**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **B**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 3,8 moléculas del compuesto **10** por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Waters Acquity UPLC BEH200 SEC 1,7 µm 4,6 x 150 mm eluyendo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración que contiene un 5 % de isopropanol (v/v) sobre una muestra de ConjA2 a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas.

Conjugado C (Ab-27, ConjC)

- Se diluyó Anticuerpo (2,5 mg, 16,7 nanomoles) en 2,25 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (1,65 equivalentes molares/anticuerpo, 27,5 nanomoles, 2,75 ml) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,6 horas en una incubadora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **27** como una solución de DMSO (7,5 equivalentes molares/anticuerpo, 125 nanomoles, en 0,25 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 1,3 horas a temperatura ambiente, después la conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (250 nanomoles, 25 ml a 10 mM), después se inyectó en una FPLC AKTA™ Pure usando una columna HiLoad™ 26/600 de GE Healthcare rellena con Superdex™ 200 PG, eluyendo con 2,6 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjC se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración.
- El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjC a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **27**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **27**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,56 moléculas del compuesto **27** por anticuerpo.
- El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna protectora de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) sobre una muestra de ConjC a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas. El análisis de UHPLC SEC da una concentración de ConjC final a 0,77 mg/ml en 2,5 ml, la masa obtenida de Conj C es 1,93 mg (77 % de rendimiento).

Conjugado D (Ab-29, ConjD)

- Se diluyó anticuerpo (3,5 mg, 23,3 nanomoles) en 3,15 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (2 equivalentes molares/anticuerpo, 46,7 nanomoles, 4,67 µl) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,6 horas en una incubadora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **29** como una solución de DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 67 nanomoles, en 0,1 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 3,9 horas a temperatura ambiente, en cuyo punto se añadió más compuesto **29** como una solución de DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 233 nanomoles, en 0,175 ml de DMSO) y la solución se mezcló durante unas 19 horas adicionales a temperatura ambiente. La conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (933 nanomoles, 93,3 ml a 10 mM), después se inyectó en una FPLC AKTA™ Pure usando una columna HiLoad™ 26/600 de GE Healthcare rellena con Superdex™ 200 PG, eluyendo con 2,6 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjD se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración.
- El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjD a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **29**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **29**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,43 moléculas del compuesto **29** por anticuerpo.
- El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna protectora de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) sobre una muestra de ConjB a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas. El análisis de UHPLC SEC da una concentración de ConjB final a 0,73 mg/ml en 3,3 ml, la masa obtenida de ConjB es 2,42 mg (69 % de rendimiento).

Conjugado E (Ab-34, ConjE)

- Se diluyó anticuerpo (2,5 mg, 16,7 nanomoles) en 2,25 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (1,65 equivalentes molares/anticuerpo, 27,5 nanomoles, 2,75 ml) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,6 horas en una incubadora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **34** como una solución de DMSO (7,5 equivalentes molares/anticuerpo, 125 nanomoles, en 0,25 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 1,3 horas a temperatura ambiente, después la conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (250 nanomoles, 25 ml a 10 mM), después se inyectó en una FPLC AKTA™ Pure usando una columna HiLoad™ 26/600 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con 2,6 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjE se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon

Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjCE a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **34**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **34**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,45 moléculas del compuesto **34** por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna protectora de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) sobre una muestra de ConjE a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas. El análisis de UHPLC SEC da una concentración de ConjE final a 1,05 mg/ml en 2,0 ml, la masa obtenida de ConjE es 2,09 mg (84 % de rendimiento).

Conjugado F (Ab-36, ConjF)

Se diluyó anticuerpo (3,5 mg, 23,3 nanomoles) en 3,15 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (2,0 equivalentes molares/anticuerpo, 46,7 nanomoles, 4,67 ml) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,6 horas en una incubadora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **36** como una solución de DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 233 nanomoles, en 0,175 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 3,9 horas a temperatura ambiente, en cuyo punto se añadió más compuesto **36** como una solución de DMSO (10 equivalentes molares/anticuerpo, 233 nanomoles, en 0,175 ml de DMSO) y la solución se mezcló durante unas 19 horas adicionales a temperatura ambiente. La conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (933 nanomoles, 93,3 ml a 10 mM), después se inyectó en una FPLC AKTA™ Pure usando una columna HiLoad™ 26/600 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con 2,6 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjF se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjF a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **36**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **36**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,57 moléculas del compuesto **36** por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna protectora de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) sobre una muestra de ConjF a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas. El análisis de UHPLC SEC da una concentración de ConjF final a 0,75 mg/ml en 3,8 ml, la masa obtenida de ConjF es 2,48 mg (81 % de rendimiento).

Conjugado G (Ab-45, ConjG)

Se diluyó anticuerpo (2,5 mg, 16,7 nanomoles) en 2,25 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio 10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,11 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (1,65 equivalentes molares/anticuerpo, 27,5 nanomoles, 2,75 ml) y la mezcla de reducción se calienta a +37 °C durante 1,6 horas en una incubadora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añade el compuesto **45** como una solución de DMSO (7,5 equivalentes molares/anticuerpo, 125 nanomoles, en 0,25 ml de DMSO). La solución se mezcla durante 1,3 horas a temperatura ambiente, después la conjugación se inactivó mediante la adición de *N*-acetil cisteína (250 nanomoles, 25 ml a 10 mM), después se inyectó en una FPLC AKTA™ Pure usando una columna HiLoad™ 26/600 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con 2,6 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de ConjG se reúnen, se concentran usando un filtro de centrifuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se analizan y se esterilizan por filtración.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de ConjG a 280 nm y 330 nm (específica del compuesto **45**) muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas del compuesto **45**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,13 moléculas del compuesto **45** por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence usando una columna Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWXL 5 µm 7,8 x 300 mm (con una columna protectora de 7 µm 6,0 x 40 mm) eluyendo con tampón SEC

esterilizado por filtración que contiene fosfato potásico 200 mM pH 6,95, cloruro potásico 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) sobre una muestra de ConjG a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 99 % sin impurezas detectadas. El análisis de UHPLC SEC da una concentración de ConjG final a 0,67 mg/ml en 2,9 ml, la masa obtenida de ConjG es 1,94 mg (78 % de rendimiento).

5

El Anticuerpo usado en las conjugaciones anteriores fue HERCEPTIN.

Ejemplo 9: Estudios de eficacia de ADC *in vivo*

10 Ratones CB.17 SCID, con edades de 8-12 semanas, pueden inyectarse subcutáneamente con fragmentos de tumor de 1 mm³ en el flanco. Cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 100 - 150 mg, se puede empezar el tratamiento. Los ratones se pueden pesar dos veces a la semana. El tamaño tumoral se puede medir dos veces a la semana. Los animales se monitorizan individualmente. El punto final del experimento es un volumen tumoral de 1000 mm³ o 60 días, lo que suceda primero. Los que responden pueden ser seguidos más tiempo.

15

Grupos de 10 ratones xenoinjertados se inyectan i.v. con 0,2 ml de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), o anticuerpo desnudo, en solución salina tamponada con fosfato (vehículo) o con 0,2 ml de vehículo solo. La concentración de ADC se ajusta para dar, por ejemplo, 0,3 o 1,0 mg de ADC/kg de peso corporal en una dosis única. Pueden administrarse tres dosis idénticas a cada ratón a intervalos de, por ejemplo, por ejemplo, 1 semana.

20

Ejemplo 10: Estudios de eficacia de ADC *in vitro*

Medio de subconfluente (aproximadamente 80-90 % de confluencia) de células SK-BR-3 en un matraz T75 se aspiró y se añadió PBS (aproximadamente 20 ml) para enjuagar el medio de cultivo. El PBS se aspiró y se añadió tripsina-EDTA (5 ml). El matraz se devolvió al incubador gaseado a 37 °C durante hasta aproximadamente 5 minutos. El matraz se golpeó fuertemente para desplazar y disociar células del plástico. La suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifugación con cierre de rosca de 50 ml estéril. Se añadió el medio (McCoy's + 10 % FCS) a un volumen final de 15 ml y, a continuación, se centrifugó el tubo (400 g durante 5 min). El sobrenadante se aspiró y a continuación los gránulos se volvieron a suspender en 10 ml de medio de cultivo. Puede ser necesario la repetición de la aspiración (arriba y abajo de una pipeta de 10 ml) para romper las agrupaciones de células y producir suspensiones celulares monodispersas adecuadas para el recuento. La suspensión celular (10µl) se mezcló con azul de tripano (10µl) y se contaron las células vivas/muertas con un haemocitómetro para determinar la concentración y viabilidad celular. La suspensión celular se diluyó a 20x10⁴/ml y se suministraron 50µl en placas con fondo plano de 96 pocillos transparentes. Las células se incubaron durante la noche para permitir su recuperación antes de su uso.

35

Se fabricó una solución madre (1 ml) de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) (20 µg/ml) mediante dilución de ADC esterilizado por filtración en un medio de cultivo celular. Se fabricó un conjunto de diluciones de 8x 10 veces de ADC de solución madre en una placa de 24 pocillos mediante transferencia en serie de 100µl sobre 900µl de medio de cultivo celular.

40

Se suministraron 50µl de cada dilución de ADC en 4 pocillos de réplica de la placa de 96 pocillos, que contenía 50µl de suspensión celular cultivada el día anterior. Los pocillos de control reciben 50µl de medio de cultivo celular. La placa de 96 pocillos que contenía células y ADC se incubó a 37 °C en un incubador gasificado con CO₂ durante 4 días. Al final del periodo de incubación, se midieron las células viables mediante ensayo de MTS. Se suministró MTS (Promega) (20µl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en el incubador gasificado con CO₂. Se midió una buena absorbancia a 490 nm. El porcentaje de supervivencia celular se calcula a partir de la absorbancia media en los pocillos tratados con 4 ADC en comparación con la absorbancia media en los 4 pocillos de control (100 %).

45

ADC	CE ₅₀ (µg/ml)
ConjD	0,001696
ConjE	0,002766
ConjF	0,003576
ConjG	0,006163
ConjC	0,0006929

50

Abreviaturas

Ac	acetilo
Acm	acetamidometilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Boc	dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
t-Bu	<i>terc</i> -butilo
Bzl	bencilo, donde Bzl-OMe es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno

Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, donde Z-Cl y Z-Br son cloro y bromobenciloxi carbonilo respectivamente
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Dnp	dinitrofenilo
DTT	ditiotreitol
Fmoc	9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
imp	grupo protector de la imina <i>N</i> -10: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB
MC-OSu	maleimidocaproil- <i>O</i> - <i>N</i> -succinimida
Moc	metoxicarbonilo
MP	maleimidopropanamida
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
PAB	para-aminobenciloxycarbonilo
PEG	etilenoxi
PNZ	carbamato de <i>p</i> -nitrobencilo
Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo
Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
Tos	tosilo
Troc	cloruro de 2,2,2-tricloretoxicarbonilo
Trt	tritulo
Xan	xantilo

Referencias

	EP 0522868
5	EP 0875569
	EP 1295944
	EP 1347046
	EP 1394274
	EP 1394274
10	EP 1439393
	JP 05003790
	JP 2004113151
	JP 58180487
	US 2001/055751
15	US 2002/034749
	US 2002/042366
	US 2002/150573
	US 2002/193567
	US 2003/0228319
20	US 2003/060612
	US 2003/064397
	US 2003/065143
	US 2003/091580
	US 2003/096961
25	US 2003/105292
	US 2003/109676
	US 2003/118592
	US 2003/119121
	US 2003/119122
30	US 2003/119125
	US 2003/119126
	US 2003/119128
	US 2003/119129
	US 2003/119130
35	US 2003/119131
	US 2003/124140
	US 2003/124579
	US 2003/129192
	US 2003/134790-A1
40	US 2003/143557
	US 2003/157089
	US 2003/165504
	US 2003/185830
	US 2003/186372
45	US 2003/186373

US 2003/194704
US 2003/206918
US 2003/219806
US 2003/224411
5 US 2003/224454
US 2003/232056
US 2003/232350
US 20030096743
US 20030130189
10 US 2003096743
US 2003130189
US 2004/0001827
US 2004/005320
US 2004/005538
15 US 2004/005563
US 2004/005598
US 2004/0101899
US 2004/018553
US 2004/022727
20 US 2004/044179
US 2004/044180
US 2004/101874
US 2004/197325
US 2004/249130
25 US 20040018194
US 20040052793
US 20040052793
US 20040121940
US 2005/271615
30 US 2006/116422
US 4816567
US 5362852
US 5440021
US 5583024
35 US 5621002
US 5644033
US 5674713
US 5700670
US 5773223
40 US 5792616
US 5854399
US 5869445
US 5976551
US 6011146
45 US 6153408
US 6214345
US 6218519
US 6268488
US 6518404
50 US 6534482
US 6555339
US 6602677
US 6677435
US 6759509
55 US 6835807
US 7223837
US 7375078
US 7521541
US 7723485
60 WO 00/012508
WO 00/12507
WO 00/12508
WO 01/16318
WO 01/45746
65 WO 02/088172
WO 03/026577

WO 03/043583
 WO 04/032828
 WO 2000/12130
 WO 2000/14228
 5 WO 2000/20579
 WO 2000/22129
 WO 2000/32752
 WO 2000/36107
 WO 2000/40614
 10 WO 2000/44899
 WO 2000/55351
 WO 2000/75655
 WO 200053216
 WO 2001/00244
 15 WO 2001/38490
 WO 2001/40269
 WO 2001/40309
 WO 2001/41787
 WO 2001/46232
 20 WO 2001/46261
 WO 2001/48204
 WO 2001/53463
 WO 2001/57188
 WO 2001/62794
 25 WO 2001/66689
 WO 2001/72830
 WO 2001/72962
 WO 2001/75177
 WO 2001/77172
 30 WO 2001/88133
 WO 2001/90304
 WO 2001/94641
 WO 2001/98351
 WO 2002/02587
 35 WO 2002/02624
 WO 2002/06317
 WO 2002/06339
 WO 2002/101075
 WO 2002/10187
 40 WO 2002/102235
 WO 2002/10382
 WO 2002/12341
 WO 2002/13847
 WO 2002/14503
 45 WO 2002/16413
 WO 2002/16429
 WO 2002/22153
 WO 2002/22636
 WO 2002/22660
 50 WO 2002/22808
 WO 2002/24909
 WO 2002/26822
 WO 2002/30268
 WO 2002/38766
 55 WO 2002/54940
 WO 2002/59377
 WO 2002/60317
 WO 2002/61087;
 WO 2002/64798
 60 WO 2002/71928
 WO 2002/72596
 WO 2002/78524
 WO 2002/81646
 WO 2002/83866
 65 WO 2002/86443
 WO 2002/88170

WO 2002/89747
 WO 2002/92836
 WO 2002/94852
 WO 2002/98358
 5 WO 2002/99074
 WO 2002/99122
 WO 2003/000842
 WO 2003/002717
 WO 2003/003906
 10 WO 2003/003984
 WO 2003/004989
 WO 2003/008537
 WO 2003/009814
 WO 2003/014294
 15 WO 2003/016475
 WO 2003/016494
 WO 2003/018621
 WO 2003/022995
 WO 2003/023013
 20 WO 2003/024392
 WO 2003/025138
 WO 2003/025148
 WO 2003/025228
 WO 2003/026493
 25 WO 2003/029262
 WO 2003/029277
 WO 2003/029421
 WO 2003/034984
 WO 2003/035846
 30 WO 2003/042661
 WO 2003/045422
 WO 2003/048202
 WO 2003/054152
 WO 2003/055439
 35 WO 2003/055443
 WO 2003/062401
 WO 2003/062401
 WO 2003/072035
 WO 2003/072036
 40 WO 2003/077836
 WO 2003/081210
 WO 2003/083041
 WO 2003/083047
 WO 2003/083074
 45 WO 2003/087306
 WO 2003/087768
 WO 2003/088808
 WO 2003/089624
 WO 2003/089904
 50 WO 2003/093444
 WO 2003/097803
 WO 2003/101283
 WO 2003/101400
 WO 2003/104270
 55 WO 2003/104275
 WO 2003/105758
 WO 2003004529
 WO 2003042661
 WO 2003104399
 60 WO 2004/000997
 WO 2004/001004
 WO 2004/009622
 WO 2004/011611
 WO 2004/015426
 65 WO 2004/016225
 WO 2004/020595

WO 2004/022709
 WO 2004/022778
 WO 2004/027049
 WO 2004/031238
 5 WO 2004/032828
 WO 2004/032842
 WO 2004/040000
 WO 2004/043361
 WO 2004/043963
 10 WO 2004/044178
 WO 2004/045516
 WO 2004/045520
 WO 2004/045553
 WO 2004/046342
 15 WO 2004/047749
 WO 2004/048938
 WO 2004/053079
 WO 2004/063355
 WO 2004/063362
 20 WO 2004/063709
 WO 2004/065577
 WO 2004/074320
 WO 2004000221
 WO 2004020583
 25 WO 2004042346
 WO 2004065576
 WO 2005/023814
 WO 2005/082023
 WO 2005/085251
 30 WO 2006/111759
 WO 2007/044515
 WO 2007/085930
 WO 2009/052249
 WO 2010/091150
 35 WO 91/02536
 WO 92/07574
 WO 92/17497
 WO 94/10312
 WO 94/28931
 40 WO 9630514
 WO 97/07198
 WO 97/44452
 WO 98/13059
 WO 98/37193
 45 WO 98/40403
 WO 98/51805
 WO 98/51824
 WO 99/28468
 WO 99/46284
 50 WO 99/58658
 Am. J. Hum. Genet. 49 (3): 555-565 (1991)
 Amiel J., y col/ Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996
 Amir y col (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4494-4499
 Amsberry, y col (1990) J. Org. Chem. 55:5867
 55 Angew Chem. Inti. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186
 Annu. Rev. Neurosci. 21: 309-345 (1998)
 Arai H. y col/ J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993
 Arai H. y col/ Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992
 Arima, y col., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)
 60 Attie T., y col, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995
 Auricchio A., y col/ Hum. Mol. Genet. 5: 351-354, 1996
 Barel M., y col/ Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998
 Barella y col (1995) Biochem. J. 309: 773-779
 Barnett T., y col/ Genomics 3, 59-66, 1988
 65 Beck y col (1992) J. Mol. Biol. 228: 433-441
 Beck y col (1996) J. Mol. Biol. 255: 1-13

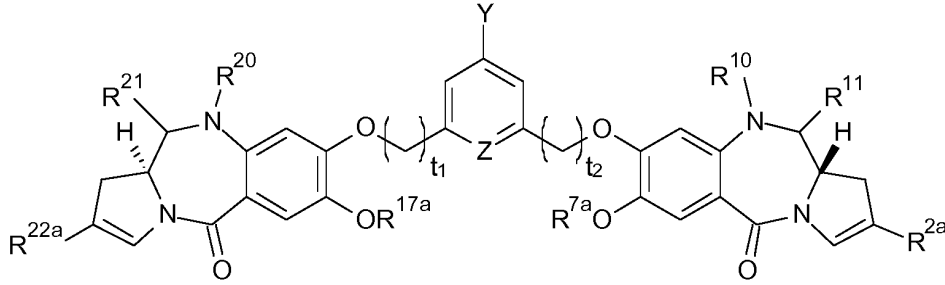
- Berge, *y col.*, J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977)
 Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3): 783-788
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999)
 Blood (2002) 100 (9):3068-3076 Blood 99 (8): 2662-2669 (2002)
 5 Blumberg H., *y col* Cell 104, 9-19, 2001
 Bose, *y col.*, Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)
 Bourgeois C., *y col* J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997
 Brinster *y col* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836
 Buchman *y* Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395
 10 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)
 Carl *y col* (1981) J. Med. Chem. 24: 479-480
 Carlsson *y col* (1978) Biochem. J. 173: 723-737
 Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6: 343-357
 Cell 109 (3): 397-407 (2002)
 15 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288
 Chakravarty *y col* (1983) J. Med. Chem. 26: 638-644
 Chan, J. *y* Watt, V. M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991)
 Child *y col* (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341
 Cho H.-S., *y col* Nature 421, 756-760, 2003
 20 Ciccodicola, A., *y col* EMBO J. 8(7): 1987-1991 (1989)
 Clackson *y col* (1991) Nature, 352: 624-628
 Clark H. F., *y col* Genome Res. 13, 2265-2270, 2003
 Corey E, Quinn JE, Buhler KR, *y col.* LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen
 independence. The Prostate 2003; 55: 239-46
 25 Coussens L., *y col* Science (1985) 230(4730): 1132-1139
 Cree *y col* (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404
 Crouch *y col* (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88
 Davis *y col* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17): 9772-9777
 de Groot *y col* (2001) J. Org. Chem. 66: 8815-8830
 30 de Groot *y col* (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42: 4490-4494
 Dennis *y col.* (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J
 Biol Chem. 277: 35035-35043
 Dobner *y col* (1992) Eur. J. Immunol. 22: 2795-2799
 Dorman *y col* (2009) Blood 114(13): 2721-2729
 35 Doronina *y col* (2006) Bioconj. Chem. 17: 114-124
 Dubowchik *y col.* Bioconjugate Chemistry, 2002, 13, 855-869
 Dubowchik, *y col.* (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60
 Dumoutier L., *y col* J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001
 E. Schröder *y* K. Lubke, The Peptides, volumen 1, págs. 76-136 (1965) Academic Press
 40 Ehsani A., *y col* (1993) Genomics 15, 426-429
 Eliel, E. *y* Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994
 Elshourbagy N. A., *y col* J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993
 Erickson *y col* (2006) Cancer Res. 66(8): 1-8
 Feild, J.A., *y col* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3): 578-582
 45 Fields, G. *y* Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluoroenylmethoxycarbonyl amino acids",
 Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161-214
 Fuchs S., *y col* Mol. Med. 7, 115-124, 2001
 Fujisaku *y col* (1989) J. Biol. Chem. 264 (4): 2118-2125)
 Gary S. C., *y col* Gene 256, 139-147, 2000
 50 Gaugitsch, H.W., *y col* (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273)
 Geiser *y col* "Automation of solid-phase peptide synthesis" in Macromolecular Sequencing and Synthesis, Alan R.
 Liss, Inc., 1988, págs. 199-218
 Genome Res. 13 (10): 2265-2270 (2003)
 Genomics 62 (2): 281-284 (1999)
 55 Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146
 Getz *y col* (1999) Anal. Biochem. Vol 273: 73-80
 Glynn-Jones *y col* (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94(2): 178-84
 Gregson *y col.*, Chem. Commun. 1999, 797-798
 Gregson *y col.*, J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174
 60 Gu Z., *y col* Oncogene 19, 1288-1296, 2000
 Ha *y col* (1992) J. Immunol. 148(5): 1526-1531
 Haendler B., *y col* J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992
 Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patentes 15(9): 1087-1103
 Hamblett *y col* (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070
 65 Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources,
 Inc., Endicott, Nueva York, EEUU)

- Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994
Hara, *y col.*, *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988)
Hashimoto *y col* (1994) *Immunogenetics* 40(4): 287-295
Hay *y col.* (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237
5 Herdwijn, P. *y col.*, *Canadian Journal of Chemistry*. 1982, 60, 2903-7
Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: Nueva York, págs. 234-242
Hochlowski, *y col.*, *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)
Hofstra R. M. W., *y col* *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997
Hofstra R. M. W., *y col* *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996 Horie *y col* (2000) *Genomics* 67: 146-152
10 Hubert, R.S., *y col* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 96 (25): 14523-14528)
Hurley *y* Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)
Immunogenetics 54 (2): 87-95 (2002)
Int. Rev. Cytol. 196: 177-244 (2000)
Itoh, *y col.*, *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)
15 J. *Biol. Chem.* 270 (37): 21984-21990 (1995)
J. Biol. Chem. 276 (29): 27371-27375 (2001)
J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002)
J. Biol. Chem. 278 (33): 30813-30820 (2003)
Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª edición, Garland Publishing, Nueva
20 York
Jeffrey *y col* (2005) *J. Med. Chem.* 48: 1344-1358
Jonsson *y col* (1989) *Immunogenetics* 29(6): 411-413
Junutula, *y col.*, 2008b *Nature Biotech.*, 26(8): 925-932
Kang, G-D., *y col.*, *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689
25 Kasahara *y col* (1989) *Immunogenetics* 30(1): 66-68
King *y col* (2002) *Tetrahedron Letters* 43: 1987-1990
Kingsbury *y col* (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447
Kohler *y col* (1975) *Nature* 256:495
Kohn, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 3-11 (1975).
30 Konishi, *y col.*, *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)
Kovtun *y col* (2006) *Cancer Res.* 66(6): 3214-3121
Kuhns J. J., *y col* *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999
Kuminoto, *y col.*, *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)
Kurebayashi *y col* (1999) *Brit. Jour. Cancer* 79(5-6): 707-717
35 Lab. *Invest.* 82 (11): 1573-1582 (2002)
Lambert J. (2005) *Current Opin. en Pharmacol.* 5: 543-549
Langley *y* Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)
Larhammar *y col* (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26): 14111-14119
Law *y col* (2006) *Cancer Res.* 66(4): 2328-2337
40 Le *y col* (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199
Leber, *y col.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)
Leimgruber, *y col.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)
Leimgruber, *y col.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965)
Levenson *y col* (1997) *Cancer Res.* 57(15): 3071-3078
45 Liang *y col* (2000) *Cancer Res.* 60: 4907-12
Manfre, F. *y col.*, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065
Marks *y col* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597
McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.*, 19(7): 299-307
Mendoza *y col* (2002) *Cancer Res.* 62: 5485-5488
50 Miller *y col* (2003) *Jour. of Immunology* 170: 4854-4861
Miura *y col* (1996) *Genomics* 38(3): 299-304
Miura *y col* (1998) *Blood* 92: 2815-2822
Moore M., *y col* *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 84, 9194-9198, 1987
Morrison *y col* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 81: 6851-6855
55 Muller *y col* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6): 1621-1625
Mungall A. J., *y col* *Nature* 425, 805-811, 2003
Nagase T., *y col* (2000) *DNA Res.* 7 (2): 143-150)
Nakamuta M., *y col* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991
Nakayama *y col* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1): 124-127
60 Naruse *y col* (2002) *Tissue Antigens* 59: 512-519
Nature 395 (6699): 288-291 (1998)
Neuberger *y* Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713
Novabiochem Catalog 2006/2007
Ogawa Y., *y col* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991
65 Okamoto Y., *y col* *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997
Oncogene 10 (5): 897-905 (1995)

- Oncogene 14(11): 1377-1382 (1997))
 Parrish-Novak J., y *col* J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002
 Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212
 Phillips y *col* (2008) Cancer Res. 68(22): 9280-9290
 5 Pingault V., y *col* (2002) Hum. Genet. 111, 198-206
 Pletnev S., i (2003) Biochemistry 42: 12617-12624
 Preud'homme y *col* (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1): 141 -146
 Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU (2003) 100 (7): 4126-4131
 Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 93 (1): 136-140 (1996)
 10 Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 98 (17): 9772-9777 (2001)
 Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 99 (26): 16899-16903 (2002)
 Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 96 (20): 11531-11536 (1999)
 Protective Groups in Organic Synthesis, Greene y Wuts, 3ª edición, 1999, John Wiley & Sons Inc.
 Puffenberger E. G., y *col* Cell 79, 1257-1266, 1994
 15 Rao y *col* (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45: 149-158
 Reiter R. E., y *col* Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 95, 1735-1740, 1998
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000
 Rodrigues y *col* (1995) Chemistry Biology 2:223
 Ross y *col* (2002) Cancer Res. 62: 2546-2553
 20 S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York
 Sakaguchi y *col* (1988) EMBO J. 7(11): 3457-3464
 Sakamoto A., Yanagisawa M., y *col* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991
 Sanderson y *col* (2005) Clin. Cancer Res. 11: 843-852
 Semba K., y *col* Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 82, 6497-6501, 1985
 25 Serenius y *col* (1987) J. Biol. Chem. 262: 8759-8766
 Shamis y *col* (2004) J. Am. Chem. Soc. 126: 1726-1731
 Sheikh F., y *col* (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010
 Shimizu, y *col*, J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982)
 Sinha S. K., y *col* (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320
 30 Storm y *col* (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815
 Strausberg y *col* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci EEUU 99: 16899-16903
 Sun y *col* (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213-2215
 Sun y *col* (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761 -1768
 Svensson P. J., y *col* Hum. Genet. 103, 145-148, 1998
 35 Swiercz J. M., y *col* J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004
 Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19: 605-614
 Takeuchi, y *col*, J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)
 Tawaragi Y., y *col* Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988
 ten Dijke, P., y *col* Science 264 (5155): 101-104 (1994)
 40 Thompson, J. S., y *col* Science 293 (5537), 2108-2111 (2001) documento WO 2004/058309
 Thurston, y *col*, Chem. Brit., 26, 767-772 (1990)
 Thurston, y *col*, Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)
 Toki y *col* (2002) J. Org. Chem. 67: 1866-1872
 Tonnelle y *col* (1985) EMBO J. 4(11): 2839-2847
 45 Touchman y *col* (2000) Genome Res. 10: 165-173
 Trail y *col* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337
 Tsunakawa, y *col*, J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)
 Tsutsumi M., y *col* Gene 228, 43-49, 1999
 Uchida y *col* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 593-602
 50 Verheij J. B., y *col* Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002
 Von Hoegen y *col* (1990) J. Immunol. 144(12): 4870-4877
 Webster y *col* (1994) Semin. Cancer Biol. 5: 69-76
 Weis J. J., y *col* J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988
 Weis J. J., y *col* Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 83, 5639-5643, 1986
 55 Wilson y *col* (1991) J. Exp. Med. 173: 137-146
 Wu y *col* (2005) Nature Biotech. 23(9): 1137-1145
 Xie y *col* (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3): 281-291
 Xu, M. J., y *col* (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3): 768-775 documento WO 2004/016225
 Xu, X. Z., y *col* Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 98 (19): 10692-10697 (2001)
 60 Yamaguchi, N., y *col* Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994)
 Yamamoto T., y *col* Nature 319, 230-234, 1986
 Yu y *col* (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fórmula (Ia):



la

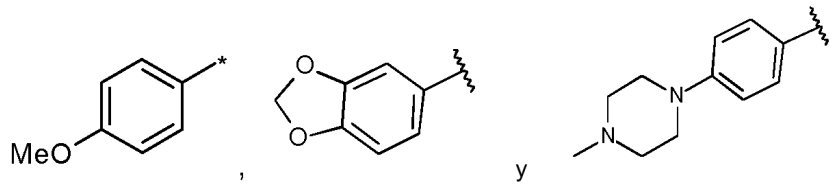
5

en la que:

R^{2a} y R^{22a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

10

(ia)



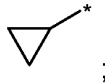
15

(ib)



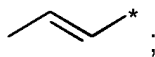
20

(ic)



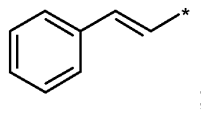
25

(ie)



30

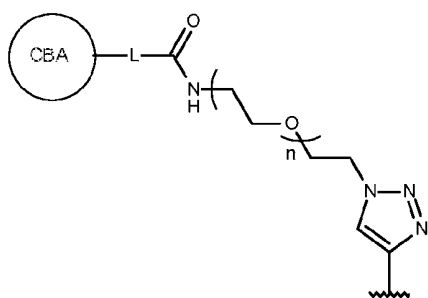
e
(if)



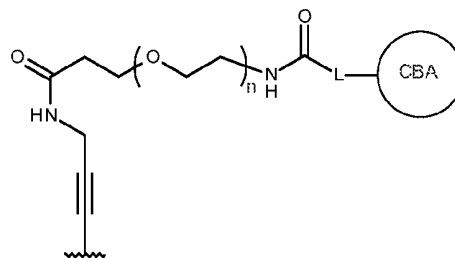
35

R^{7a} y R^{17a} se seleccionan independientemente de metilo y fenilo;
Y se selecciona de las fórmulas A1, A2, A3, A4, A5 y A6:

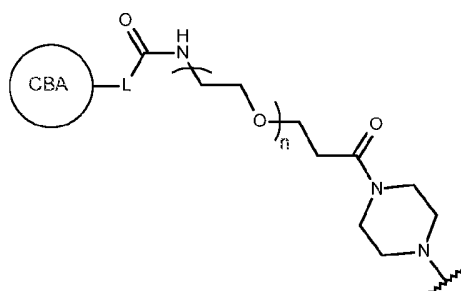




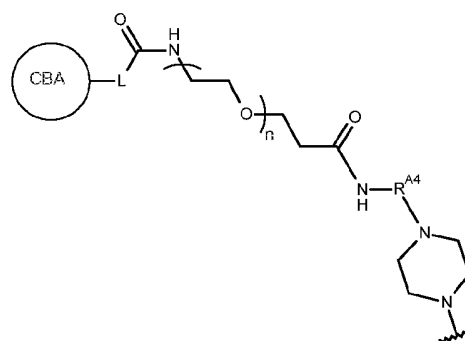
(A1)



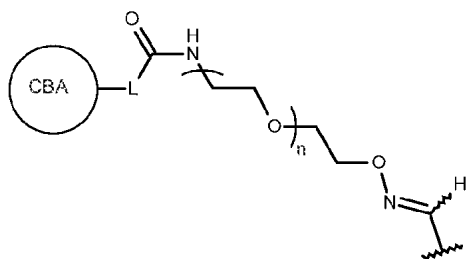
(A2)



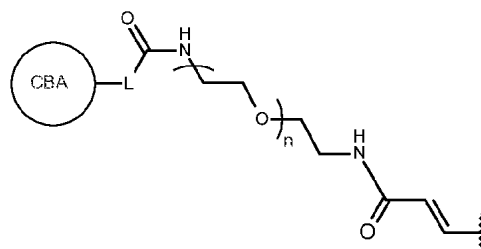
(A3)



(A4)



(A5)



(A6)

5

L es un enlazador conectado a un agente de unión celular;
 CBA es el agente de unión celular;
 n es un número entero seleccionado en el intervalo de 0 a 48;
 R^{A4} es un grupo alqueno C₁₋₆;
 bien

10

(a) R¹⁰ es H y R¹¹ es OH, OR^A, donde R^A es alquilo C₁₋₄; o

(b) R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y de carbono a los que están unidos; o

(c) R¹⁰ es H y R¹¹ es OSO₂M, donde z es 2 o 3 y M es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable;

15

en donde R²⁰ y R²¹ son como se definen para R¹⁰ y R¹¹ respectivamente;

en donde Z es CH o N; y

t₁ y t₂ se seleccionan independientemente de 0, 1 y 2.

20

2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹⁰ es H y R¹¹ es OH.

3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹⁰ y R¹¹ forman un doble enlace nitrógeno-carbono entre los átomos de nitrógeno y carbono a los cuales están unidos.

25

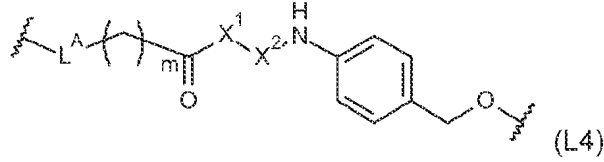
4. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R^{17a}, R²⁰, R²¹ y t₂ son los mismos que R^{7a}, R¹⁰, R¹¹ y t₁ respectivamente.

30

5. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que L es de fórmula:

- (a) $-L^A-(CH_2)_m-$ (L1) donde m es de 0 a 6;
- (b) $-L^A-(CH_2)_m-O-$ (L2) donde m es de 0 a 6;
- (c) $-L^A-(CH_2)_q-O-C(=O)-NH-(CH_2)_p-$ (L3) donde q es de 1 a 3 y p es de 1 a 3; y
- (d)

5



donde m es de 0 a 6;

- 10 X^1 y X^2 son grupos de aminoácidos, seleccionados de aminoácidos naturales, que pueden estar modificados y L^A se selecciona de

(LA1-1)		(LA6)	
(LA1-2)		(LA7)	
(LA2)		(LA8-1)	
(LA3-1)		(LA8-2)	
(LA3-2)		(LA9-1)	
(LA4)		(LA9-2)	
(LA5)			

15

donde Ar representa un grupo arileno C_{5-6} .

6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el grupo -X₁-X₂- se selecciona de:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-.

5

7. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo.

10

8. El conjugado de la reivindicación 7 en el que el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo, es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de superficie celular seleccionados de (1)-(36):

15

(1) BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea tipo IB);

(2) E16 (ILAT1, SLC7A5);

(3) STEAP1 (antígeno epitelial seis transmembrana de próstata)

(4) 0772P (CA125, MUC16);

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocito, mesotelina);

20

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia 34 de vehículo soluto (fosfato sódico), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio tipo II);

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto (semaforina) 5B);

25

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN ADNc 2700050C12, gen RIKEN ADNc 2700050C12);

(9) ETBR (receptor de tipo B de endotelina);

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado a cáncer de próstata, proteína 1 asociada a cáncer de próstata, antígeno epitelial seis transmembrana de próstata 2, proteína de próstata seis transmembrana);

30

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4);

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);

(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento 2) o C3DR (C3d/receptor del virus de Epstein Barr) o Hs 73792);

35

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (beta asociado a inmunoglobulina), B29);

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje 1a de fosfatasa que contiene un dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);

(17) HER2;

(18) NCA;

40

(19) MDP;

(20) IL20Rα

(21) Brevican;

(22) EphB2R;

(23) ASLG659;

45

(24) PSCA;

(25) GEDA;

(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de células B, receptor BLyS 3, BR3);

(27) CD22 (isoforma CD22-B del receptor de células B);

(28) CD79a (CD79A, CD79α, alfa asociado a inmunoglobulina);

50

(29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt);

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de molécula de MHC de clase II (antígeno Ia);

(31) P2X5 (canal iónico 5 activado por ligando del receptor purinérgico P2X);

(32) CD72 (antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2);

(33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR);

55

(34) FcRH (proteína 1 tipo receptor Fc);

(35) IRTA2 (receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas asociado a traslocación 2);

(36) TENB2 (proteoglicano transmembrana putativo);

(37) CD33 (molécula CD33, SIGLEC-3, SIGLEC3, p67; antígeno CD33 (gp67); gp67; antígeno CD33 de superficie de células mieloides; lectina 3 tipo Ig de unión a ácido siálico, lectina tipo IgG de unión a ácido siálico);

60

(38) LGR5/GPR49.

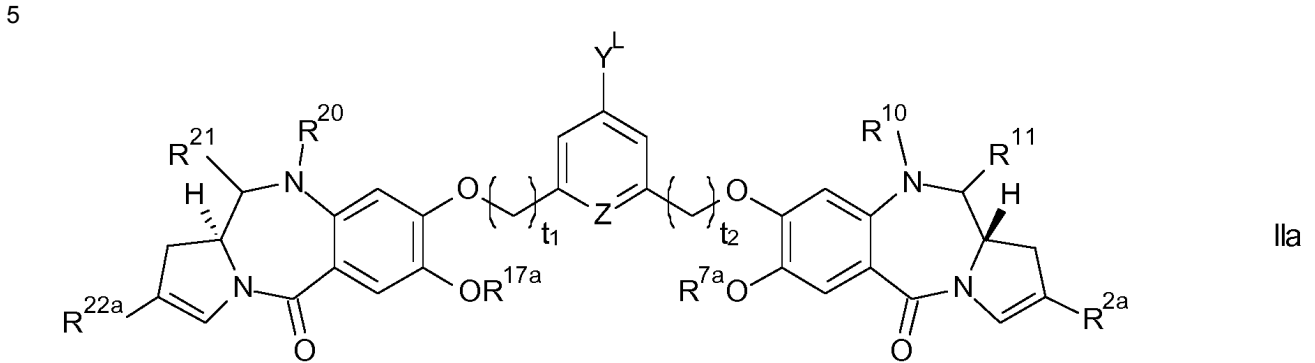
9. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia.

65

10. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

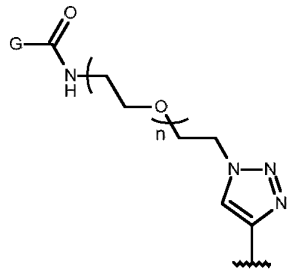
11. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

12. Un compuesto de fórmula (IIa):

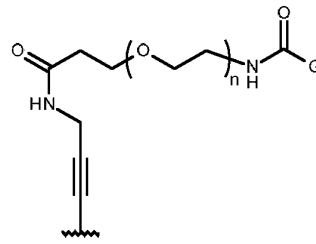


en la que:

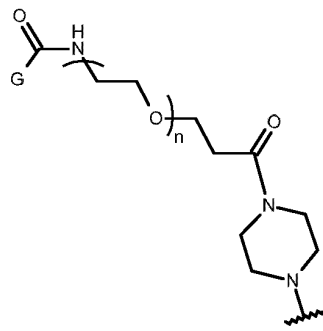
10 R^{2a} , R^{7a} , R^{10} , R^{11} , R^{17a} , R^{20} , R^{21} , R^{22a} , Z , t_1 y t_2 son como se define en la reivindicación 1; Y^L se selecciona de un grupo de fórmulas B1, B2, B3, B4, B5 y B6:



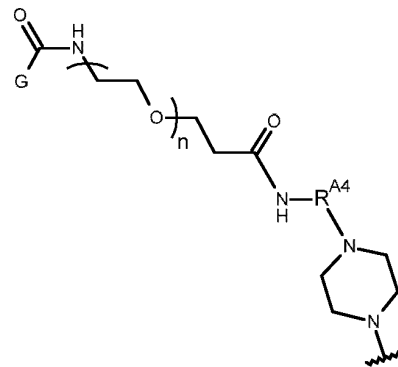
(B1)



(B2)

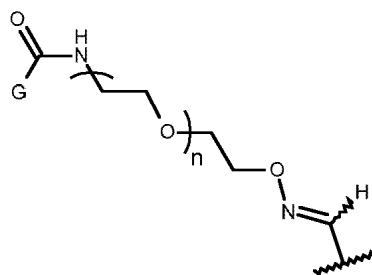


(B3)

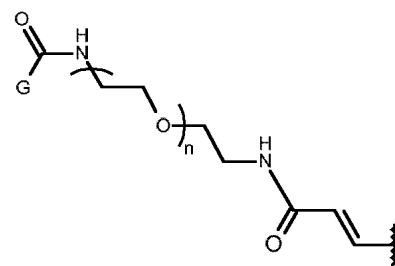


(B4)

15



(B5)

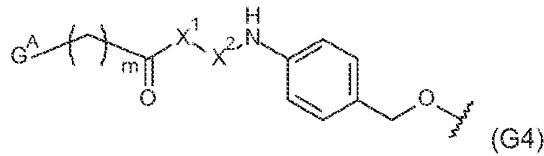


(B6)

G es un grupo reactivo para conectar a un agente de unión celular en donde n y R^{A4} son como se definen en la reivindicación 1.

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en el que G es de fórmula:

- (a) G^A-(CH₂)_m- (G1) donde m es de 0 a 6;
 (b) G^A-(CH₂)_m-O- (G2) donde m es de 0 a 6;
 (c) G^A-(CH₂)_q-O-C(=O)-NH-(CH₂)_p- (G3) donde q es de 1 a 3 y p es de 1 a 3;
 (d)

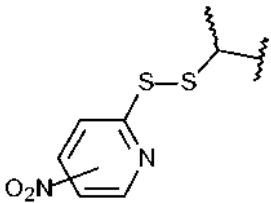

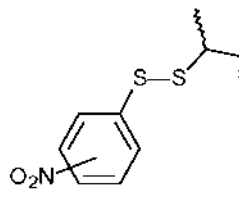


donde m es de 0 a 6;

- 15 X¹ y X² son grupos de aminoácidos, seleccionados de aminoácidos naturales, que pueden estar modificados y G^A se selecciona de:

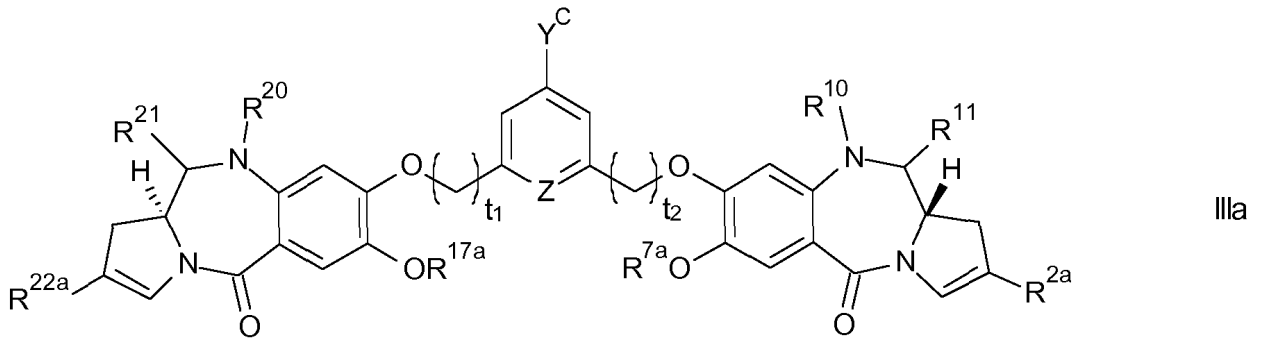
(G ^{A1-1})		(G ^{A4})	 donde Hal = I, Br, Cl
(G ^{A1-2})		(G ^{A5})	
(G ^{A2})		(G ^{A6})	
(G ^{A3-1})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{A7})	
(G ^{A3-2})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{A8})	

(continuación)

(G ^{A3-3})	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(G ^{A9})	
(G ^{A3-4})	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>		

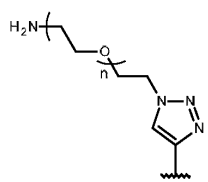
donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆.

5 14. Un compuesto de fórmula (IIIa):

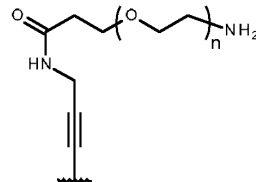


en la que:

10 R^{2a}, R^{7a}, R¹⁰, R¹¹, R^{17a}, R²⁰, R²¹, R^{22a}, Z, t₁ y t₂ son como se define en la reivindicación 1; e Y^C se selecciona de un grupo de fórmulas C1, C2, C3, C4, C5 y C6:

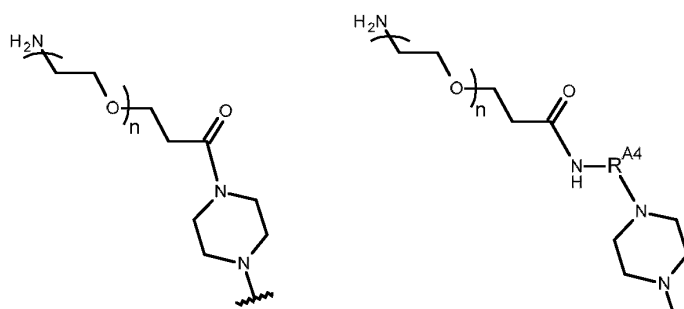


(C1)



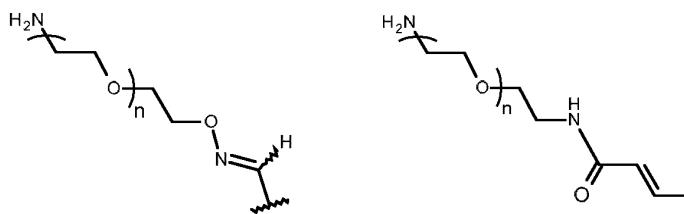
(C2)

15



(C3)

(C4)



(C5)

(C6)

5 en las que n y R^{A4} son como se define en la reivindicación 1.

15. Un método de síntesis de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa de conjugar un enlazador de fármacos de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 12 o la reivindicación 13 con un agente de unión celular.