

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 386**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**C07D 519/00** (2006.01)

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2016 PCT/US2016/013154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16115201**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2016 E 16702266 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3245207**

54 Título: **Dímeros de benzodiazepina unidos por heteroarileno, conjugados de los mismos y métodos de preparación y uso**

30 Prioridad:

**14.01.2015 US 201562103157 P**  
**09.09.2015 US 201562215938 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2020**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)**  
**Route 206 and Province Line Road**  
**Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**MCDONALD, IVAR, M.;**  
**CHOWDARI, NAIDU, S.;**  
**JOHNSON, WALTER, LEWIS;**  
**ZHANG, YONG;**  
**BORZILLERI, ROBERT, M. y**  
**GANGWAR, SANJEEV**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 747 386 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

Dímeros de benzodiazepina unidos por heteroarileno, conjugados de los mismos y métodos de preparación y uso

5 **Campo técnico de la invención**

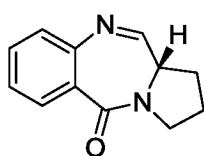
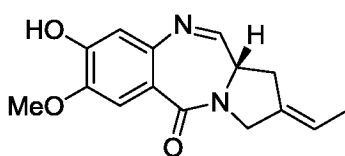
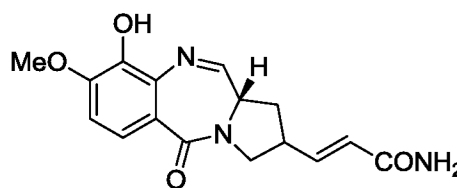
La presente invención se refiere a dímeros de benzodiazepina que tienen un grupo heteroaromático entre las dos unidades diméricas, compuestos dímero-enlazador derivados de los mismos, conjugados de los mismos, métodos para su preparación y dichos dímeros, compuestos y conjugados para su uso en métodos.

10

**Antecedentes de la técnica**

Algunas citotoxinas de origen natural, tales como la tomaymicina y la antramycin, contienen un sistema de anillo de benzodiazepina. Como reflejo de la presencia adicional de un anillo de pirrolidina condensado con el anillo de diazepina, estos compuestos con frecuencia se denominan pirrolobenzodiazepinas o PBD.

15

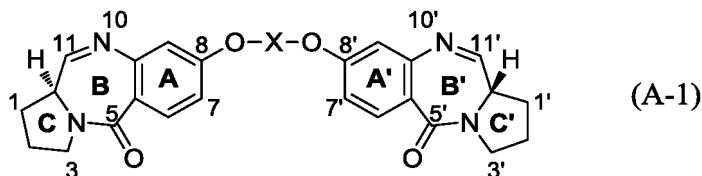
**Armazón de PBD****Tomaymicina****Antramycin**

Las PBD poseen actividad antibiótica y antitumoral, conduciendo este último rasgo a interesarse por ellos como fármacos antineoplásicos. En cuanto al mecanismo, las PBD se unen al surco menor del ADN de forma selectiva de secuencia y alquilan el ADN. Se ha estudiado la relación estructura-actividad (REA) de diferentes sustituyentes (Antonow *et al.* 2010; Thurston *et al.* 1999).

20

Estudios adicionales han demostrado que los dímeros de PBD se muestran especialmente prometedores como agentes antineoplásicos. La estructura núcleo de un dímero de PBD típico puede representarse por la fórmula (A-1), en la que X es un grupo de unión que conecta las dos mitades del dímero.

25

**(A-1)**

Al igual que con las PBD monoméricas, los dímeros son unidores-alquilantes del surco menor del ADN. Al ser bifuncional, la alquilación por un dímero da como resultado ADN entrecruzado, lo que dificulta la reparación del ADN. (La alquilación de ADN se produce a través del grupo imina. Las PBD que tienen uno de los grupos imina reducidos aún pueden alquilar ADN, pero no pueden entrecruzarlo. Todavía son biológicamente activas, aunque generalmente menos, pero su perfil farmacocinético diferente puede ser preferible para algunas aplicaciones). Para obtener una revisión sobre la evolución de los PBD como agentes antitumorales, desde monómeros naturales hasta monómeros sintéticos y dímeros sintéticos, véase Hartley 2011.

30

35

La REA de los dímeros de PBD se ha explorado a través de sustituyentes en los anillos A/A' y C/C', la insaturación en los anillos C/C', la estructura y la longitud del grupo de unión X y la oxidación o reducción de los dobles enlaces de imina en los anillos B/B', y combinaciones de dichas características. Véase Bose *et al.* 1992, Gregson *et al.* 1999, Gregson *et al.* 2001a y 2001b, Gregson *et al.* 2004, Gregson *et al.* 2009, Hartley *et al.* 2012, Howard *et al.* 2007, Howard *et al.* 2009a, Howard *et al.* 2010, Howard *et al.* 2013a y 2013b, Liu *et al.* 2007, Thurston *et al.* 1996, Thurston *et al.* 2006 y Thurston *et al.* 2008. La mayoría de los dímeros de PBD se unen a través de un puente 8/8' como se ha mostrado anteriormente, pero también se ha desvelado un puente 7/7' (Howard *et al.* 2009b).

40

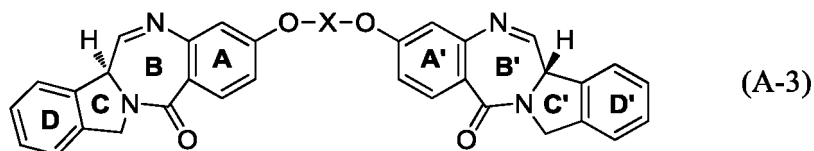
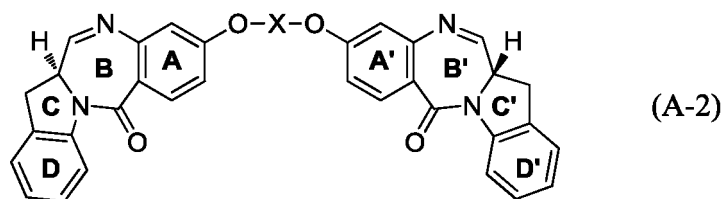
45

Un tipo de agente antineoplásico que está generando un gran interés es un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF, también denominado inmunoconjugado). En un CAF, un agente terapéutico (también denominado fármaco, carga útil u ojiva) está unido covalentemente a un anticuerpo cuyo antígeno es expresado por una célula cancerosa (antígeno asociado a tumor). El anticuerpo, mediante la unión al antígeno, entrega el CAF al sitio del cáncer. Allí, la escisión del enlace covalente o la degradación del anticuerpo conduce a la liberación del agente terapéutico. Por el contrario, mientras el CAF circula en el sistema sanguíneo, el agente terapéutico se mantiene inactivo debido a su enlace covalente con el anticuerpo. Por tanto, el agente terapéutico utilizado en un CAF puede ser mucho más potente (es

50

decir, citotóxico) que los agentes quimioterápicos normales debido a su liberación localizada. Para obtener una revisión sobre los CAF, véase Schrama *et al.* 2006.

- 5 Se han propuesto dímeros de PBD como fármaco en un CAF. La unión del enlazador que se conecta con el anticuerpo puede realizarse a través de un grupo funcional ubicado en un anillo C/C', el grupo de unión X o por adición a través del grupo imina en un anillo B/B'. Véase Beau-Larvor *et al.* 2014, Bouchard *et al.* 2013, Commercon *et al.* 2013a y 2013b, Flygare *et al.* 2013, Gauzy *et al.* 2012, Howard 2104a-2014e, Howard *et al.* 2011, Howard *et al.* 2013c y 2013d, Howard *et al.* 2014a-2014 h, Jeffrey *et al.* 2013, Jeffrey *et al.* 2014a y 2014b, y Zhao *et al.* 2014.
- 10 También se ha propuesto otro tipo de dímero de benzodiazepina como fármaco para su uso en CAF. Estructuralmente, este tipo puede verse como un dímero de PBD que tiene adicionalmente un anillo de fenilo condensado con cada uno de los anillos C/C', como se muestra en las fórmulas (A-2) y (A-3). Véase Chari *et al.* 2013, Li *et al.* 2013, Fishkin *et al.* 2014, Li *et al.* 2014.



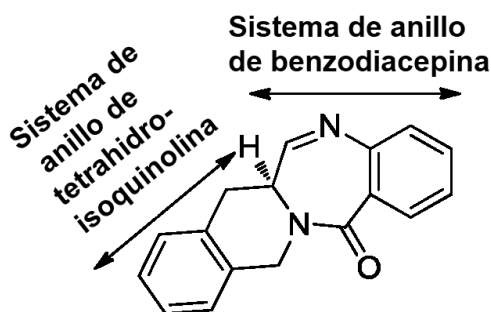
También se han desvelado compuestos de benzodiazepina que tienen otros sistemas de anillo, tales como una tetrahydro-isoquinolino[2,1-c][1,4]benzodiazepina. Kothakonda *et al.* 2004.

Fishkin *et al.* 2012 describe compuestos de benzodiazepinas útiles en la preparación de conjugados.

25 Las citas completas de los documentos citados en el presente documento por el primer autor o inventor y el año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva.

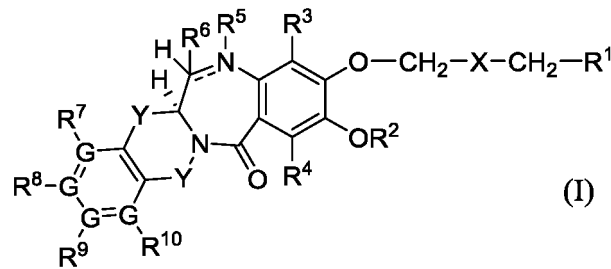
### Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona nuevos dímeros de benzodiazepina, en los que al menos una de las unidades de benzodiazepina tiene un sistema de anillo de tetrahydroisoquinolina (THIQ) condensado con un sistema de anillo de benzodiazepina y tiene adicionalmente un resto heteroarileno en el puente que une las dos unidades diméricas. Opcionalmente, el enlace de imina en el sistema de anillo de benzodiazepina puede reducirse.



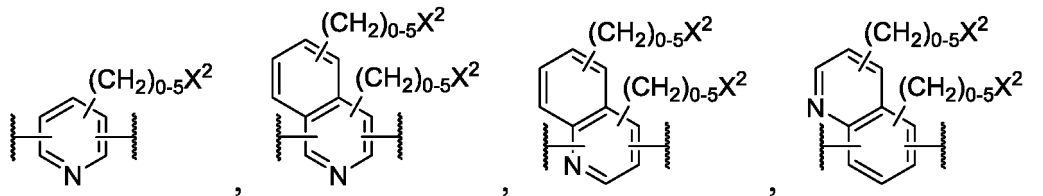
40 Ambas unidades (mitades) del dímero pueden tener un sistema de anillo de THIQ ("dímero THIQ-THIQ" u "homodímero THIQ") o una unidad puede tener un sistema de anillo de THIQ mientras que la otra unidad tiene un sistema de anillo de benzodiazepina diferente, tal como un sistema de anillo de PBD (generalmente, un "heterodímero de THIQ" o, en este ejemplo particular, un "dímero THIQ-PBD"). En un dímero THIQ-THIQ, las dos unidades pueden ser idénticas ("dímero THIQ-THIQ simétrico") o diferentes ("dímero THIQ-THIQ asimétrico").

Por tanto, la presente invención proporciona un dímero de benzodiazepina que tiene una estructura representada por la fórmula (I):

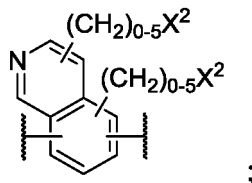


en la que

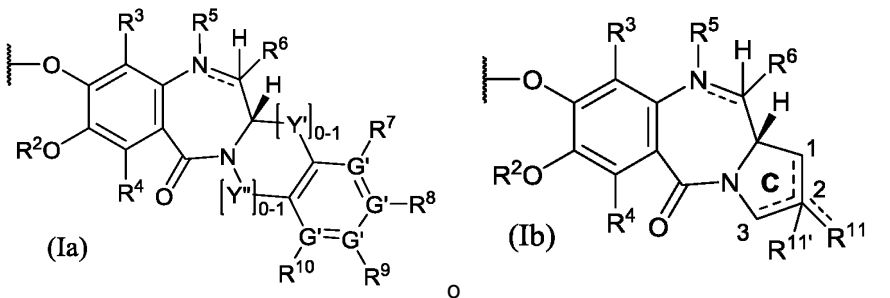
5 X se selecciona entre el grupo que consiste en



10 y



R<sup>1</sup> es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):



15 cada G y G' es C o N, a la condición de que no más de dos G o dos G' sean N; cada R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1-5</sub>;

20 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo C<sub>1-3</sub>, O(alquilo C<sub>1-3</sub>), ciano, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>NH<sub>2</sub> o NO<sub>2</sub>;

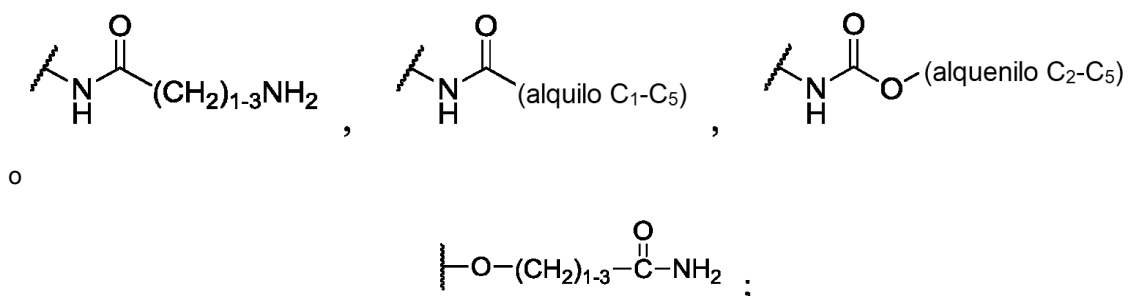
cada línea doble  $\equiv$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

cada R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\equiv$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

25 cada R<sup>6</sup> es H, OH, SO<sub>3</sub>Na o SO<sub>3</sub>K si la línea doble  $\equiv$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

cada R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1-5</sub>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, OH, O(alquilo C<sub>1-5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>,

30



5  
 10 o donde un R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está unido a un G o G' que es N, tal como R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está ausente; las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>; R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

15 R<sup>11</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H; cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHHN<sub>2</sub> o C(=O)NHHN<sub>2</sub>; cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; e Y' e Y'' son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y'';

20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un dímero de fórmula (I) unido covalentemente a un resto de direccionamiento que se une específicamente o preferentemente a una entidad química en una célula diana, célula diana que es preferentemente una célula cancerosa. Preferentemente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal; incluso más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano, y la entidad química es un antígeno asociado a tumor. El antígeno asociado a tumor puede ser uno que se presenta en la superficie de una célula cancerosa o uno que es secretado por una célula cancerosa en el espacio extracelular circundante. Preferentemente, el antígeno asociado a tumor es uno que es sobreexpresado por la célula cancerosa en comparación con las células normales o uno que es expresado por las células cancerosas pero no por las células normales.

En otra realización, se proporciona un dímero de acuerdo con la fórmula (I) unido covalentemente a un resto enlazador que tiene un grupo funcional reactivo, adecuado para la conjugación con un resto de direccionamiento.

35 En otra realización, se proporciona un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento. En otra realización, se proporciona el uso de un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer. Un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento también puede usarse para inhibir la proliferación, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, de células cancerosas. Especialmente, el cáncer puede ser cáncer de pulmón o gástrico.

#### 45 Breve descripción de los dibujos

Las Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 19A, 19B y 21 muestran esquemas para la síntesis de diversos intermedios útiles en la preparación de dímeros de la presente invención.

50 Las Fig. 6, 8, 9, 11, 14, 16, 18 y 22 muestran esquemas para la síntesis de diversos dímeros de la presente invención.

Las Fig. 7A, 7B, 10, 12A, 12B, 13, 15, 17 y 20 muestran esquemas para la síntesis de diversos dímeros-enlazadores de la presente invención.

#### 55 Descripción de realizaciones

##### Definiciones

"Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o variantes monocatenarias de los mismos. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al

menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera ( $V_L$  o  $V_k$ ) y una región constante de cadena ligera que comprende un único dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) más conservadas. Cada  $V_H$  y  $V_L$  comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno X si el anticuerpo se une al antígeno X con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $6 \times 10^{-9}$  M o menos, más preferentemente  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, incluso más preferentemente  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada puede diseñarse por ingeniería genética para que afecte al tipo o la extensión de la glucosilación, prolongue la semivida del anticuerpo, potencie o reduzca las interacciones con las células efectoras o el sistema del complemento, o module alguna otra propiedad. La modificación por ingeniería industrial puede lograrse mediante el reemplazo, la adición o la supresión de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio con un dominio de otro tipo de inmunoglobulina o una combinación de los anteriores.

"Fragmento de unión a antígeno" y "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo") significan uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 6ª Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Son fragmentos de unión a antígeno preferidos los fragmentos Fab,  $F(ab')_2$ , Fab', Fv y Fd. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario, o scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también están incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del antígeno X). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas X de otras especies. En determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado se une específicamente al antígeno X humano y no reacciona de forma cruzada con otros antígenos antígeno X (no humanos). Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

"Anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" significa una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, que muestra una especificidad y afinidad de unión única para un epítipo particular.

"Anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto la región marco conservada como la CDR (y la región constante, si está presente) derivan de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco conservadas humanas.

"Anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única, que tiene regiones variables en las que tanto la región marco conservada como la CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo,

un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

5 "Alifático" significa un resto hidrocarbonado no aromático de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene el número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, como en "alifático C<sub>3</sub>", "alifático C<sub>1-5</sub>", "alifático C<sub>1-C<sub>5</sub></sub>", o "alifático de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>", siendo las últimas tres frases sinónimos de un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (de 2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados). Se aplica una comprensión similar al número de carbonos en otros tipos, como en el alqueno C<sub>2-4</sub>, cicloalifático C<sub>4-C<sub>7</sub></sub>, etc. En una vena similar, un término tal como "(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>" ha de entenderse como abreviatura para el subíndice que es 1, 2 o 3, de manera que dicho término represente CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.

15 "Alquilo" significa un resto alifático saturado, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquilo C<sub>1-C<sub>4</sub></sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, t-butilo, 1-butilo, 2-butilo y similares. "Alquilenilo" significa un homólogo divalente de un grupo alquilo, tal como CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.

20 "Alquenilo" significa un resto alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquenilo C<sub>2-C<sub>4</sub></sub> incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, E- (Z-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.

25 "Alquinilo" significa un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los grupos alquinilo C<sub>2-C<sub>4</sub></sub> incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.

30 "Cicloalifático" significa un resto hidrocarbonado no aromático saturado o insaturado, que tiene de 1 a 3 anillos, teniendo cada anillo de 3 a 8 (preferentemente de 3 a 6) átomos de carbono. "Cicloalquilo" significa un resto cicloalifático en el que cada anillo está saturado. "Cicloalquenilo" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. "Cicloalquinilo" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. A modo de ilustración, los restos cicloalifáticos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Son restos cicloalifáticos preferidos los cicloalquilo, especialmente ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. "Cicloalquilenilo" significa un homólogo divalente de un grupo cicloalquilo.

35 "Heterocicloalifático" significa un resto cicloalifático en el que, en al menos un anillo del mismo, se han reemplazado hasta tres (preferentemente de 1 a 2) carbonos con un heteroátomo seleccionado independientemente entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden estar oxidado y el N opcionalmente puede estar cuaternizado. De manera similar, "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", y "heterocicloalquinilo" significan un resto cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en el que al menos un anillo del mismo se ha modificado de esta manera. Los restos heterocicloalifáticos de ejemplo incluyen aziridinilo, azetidino, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropirranilo, tetrahidrotiopianilo, tetrahidrotiopianil sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, sulfóxido de tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo y similares. "Heterocicloalquilenilo" significa un homólogo divalente de un grupo heterocicloalquilo.

40 "Alcoxi", "ariloxi", "alquiltio", y "ariltio" significan -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Son ejemplos metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.

50 "Halógeno" o "halo" significa flúor, cloro, bromo o yodo.

55 "Arilo" significa un resto hidrocarbonado que tiene un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos en el sistema de anillo pueden condensarse entre sí (como en el naftilo) o unirse entre sí (como en el bifenilo) y pueden condensarse con o unirse a anillos no aromáticos (como en el indanilo o el ciclohexilfenilo). A modo de ilustración adicional, los restos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antraceno y acenafilo. "Arieno" significa un homólogo divalente de un grupo arilo, por ejemplo, 1,2-fenileno, 1,3-fenileno o 1,4-fenileno.

60 "Heteroarilo" significa un resto que tiene un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden estar oxidado y el N opcionalmente puede estar cuaternizado. Dicho anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo puede condensarse con otros tipos de anillos (como en el benzofuranilo o el tetrahidroisoquinolilo) o unirse directamente a otros tipos de anillos (como en el fenilpiridilo o el 2-ciclopentilpiridilo). A modo de ilustración adicional, los restos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo,

quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, benzoimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares. "Heteroarileno" significa un homólogo divalente de un grupo heteroarilo.

- 5 Cuando se indica que un resto puede estar sustituido, tal como mediante el uso de la frase "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido" como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> sin sustituir o sustituido" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", dicho resto puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, preferentemente de uno a cinco en número, más preferentemente uno o dos en número. Los sustituyentes y los patrones de sustitución pueden ser seleccionados por un experto en la materia, teniendo en cuenta el resto al que está unido el sustituyente,
- 10 para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse mediante técnicas conocidas en la materia, así como los métodos establecidos en el presente documento. Cuando se identifica un resto como que está "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido", en una realización preferida dicho resto está sin sustituir.
- 15 "Aralalquilo", "(heterocicloalifático)alquilo", "arilalqueno", "arilalquino", "biarilalquilo" y similares significan un resto alquilo, alqueno o alquino, según el caso, sustituido con un arilo, heterocicloalifático, biarilo, etc., resto, según el caso, con la valencia abierta (insatisfecha) en el resto alquilo, alqueno o alquino, por ejemplo, como en bencilo, fenetilo, N-imidazoliletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, "alquilarilo", "alquencilcloalquilo" y similares significan un resto arilo, cicloalquilo, etc., según el caso, sustituido con un resto alquilo, alqueno, etc., según el
- 20 caso, por ejemplo, como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. "Hidroxi-alquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo" y similares significan un resto alquilo, arilo, etc., resto, según el caso, sustituido con uno o más del sustituyente identificado (hidroxilo, halo, etc., según el caso).

Por ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, pero sin limitación, alquilo (especialmente metilo o etilo), alqueno (especialmente alilo), alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (especialmente

25 fluoro), haloalquilo (especialmente trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (especialmente hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo) (especialmente -OCF<sub>3</sub>), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -

30 OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo), -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub> y similares.

35 Cuando el resto que está sustituido es un resto alifático, son sustituyentes preferidos arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -

40 OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Son sustituyentes más preferidos halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo),

45 -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Son especialmente preferidos fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, O(alquilen C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)OH y O(alquilen C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)halo.

50 Cuando el resto que está sustituido es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, son sustituyentes preferidos alquilo, alqueno, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -

55 OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Son sustituyentes más preferidos alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -

60 C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Se prefieren especialmente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ciano, nitro halo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

65 Cuando se establece un intervalo, como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>" o "del 5 al 10 %", dicho intervalo incluye los puntos finales del intervalo, como en C<sub>1</sub> y C<sub>5</sub> en el primer caso y el 5 % y el 10 % en el segundo caso.



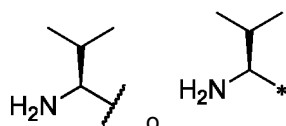
5 A menos se indiquen específicamente estereoisómeros particulares (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro pertinente en una fórmula estructural, mediante la representación de un doble enlace que tenga configuración E o Z en una fórmula estructural o mediante el uso de nomenclatura de designación estereoquímica), todos los estereoisómeros se incluyen dentro del alcance de la invención, como compuestos puros así como mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, la presente invención abarca enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos individuales y combinaciones y mezclas de los mismos.

10 Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos pueden tener formas tautoméricas (por ejemplo, formas ceto y enol), formas de resonancia y formas zwitteriónicas que son equivalentes a las representadas en las fórmulas estructurales utilizadas en el presente documento y que las fórmulas estructurales abarcan dichas formas tautoméricas, de resonancia o zwitteriónicas.

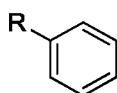
15 "Ester farmacéuticamente aceptable" significa un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto parental o una sal del mismo o una tiene actividad, por sí mismo, similar a la del compuesto parental. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, de alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> o de alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, especialmente metilo, etilo o n-propilo.

20 "Sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de un compuesto adecuado para formulación farmacéutica. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición de ácido, tal como un sulfato, bromhidrato, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), yodhidrato, nitrato, clorhidrato, lactato, metilsulfato, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato y similares. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos ácidos, la sal puede ser una sal tal como una sal de calcio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de meglumina, sal de amonio, sal de cinc, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de litio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de 4-fenilciclohexilamina, sal de benzatina, sal de sodio, sal de tetrametilamonio y similares. También se incluyen las formas cristalinas polimórficas y los solvatos dentro del alcance de la presente invención.

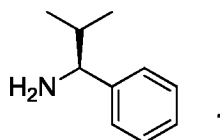
30 En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, una línea ondulada (~~~~~) transversal a un enlace o un asterisco (\*) al final del enlace denota un sitio de unión covalente. Por ejemplo, una afirmación de que R es



35 en la fórmula

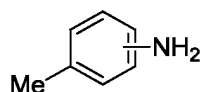


se refiere a

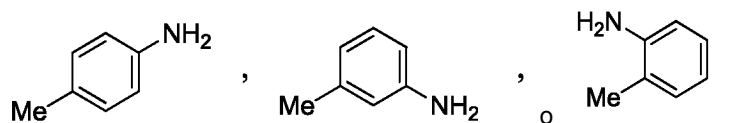


40 En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, un enlace que atraviesa un anillo aromático entre dos carbonos del mismo significa que el grupo unido al enlace puede estar ubicado en cualquiera de las posiciones disponibles del anillo aromático. A modo de ilustración, la fórmula

45

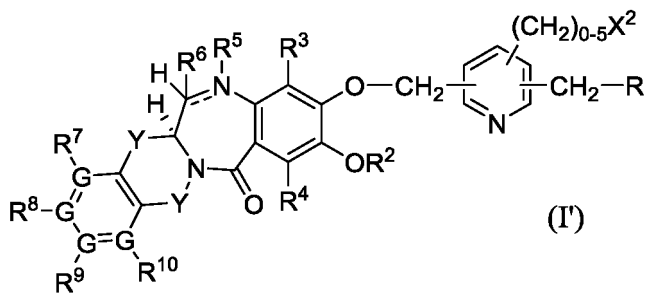


representa



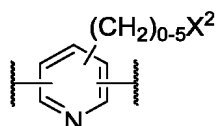
DÍMEROS

- 5 Una realización preferida de dímeros de benzodiazepina de acuerdo con la fórmula (I) tiene una estructura representada por la fórmula (I'), donde el significado de las variables en la fórmula (I') es como se define en la fórmula (I):



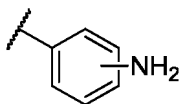
;

- 10 es decir, la fórmula (I') difiere de la fórmula (I) en que X es

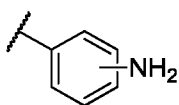


- 15 En la fórmula (I) y los subgéneros de la misma, y las fórmulas relacionadas para compuestos dímero-enlazador y conjugados, se prefieren las siguientes preferencias a menos que se indique una preferencia más específica en el contexto de una fórmula particular:

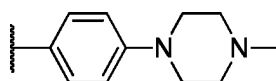
- 20 (a) Cuando una fórmula comprende dos sistemas de anillo de benzodiazepina con línea doble  $\equiv$ , no más de una línea doble  $\equiv$  representa un enlace sencillo. Más bien, preferentemente, ambos son dobles enlaces o, como alternativa, uno es un enlace sencillo y el otro es un doble enlace.  
 (b) cada  $R^2$ , cuando está presente en una fórmula, es Me y, más preferentemente, cada  $R^2$  es Me y cada  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^{10}$ , cuando está presente en una fórmula, es H.  
 (c) Cada Y, cuando está presente en una fórmula, es  $CH_2$ .  
 25 (d) Cada  $R^9$ , cuando está presente en una fórmula, es independientemente H, OH, OMe,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ ,  $OCH_2CH_2OH$  o



- 30 (especialmente el *para*-isómero).  
 (e) Cuando está presente en una fórmula, cada G' es C e Y' e Y'' son los dos  $CH_2$  o un G' es N, Y' es  $CH_2$  e Y'' está ausente.  
 (f) Cuando está presente en una fórmula,  $R^{11}$  es H,  $=CH_2$ ,  $CH=CHMe$ ,  $=CHMe$ ,  $C\equiv CCH_2NH_2$ ,

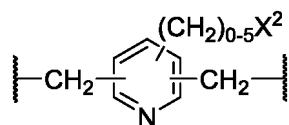


- 35 (especialmente el *para*-isómero) o

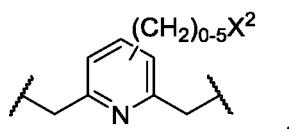


40

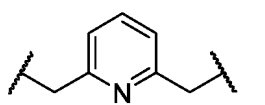
(h) El grupo de unión



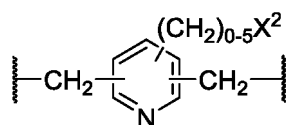
5 es



10 y más preferentemente es



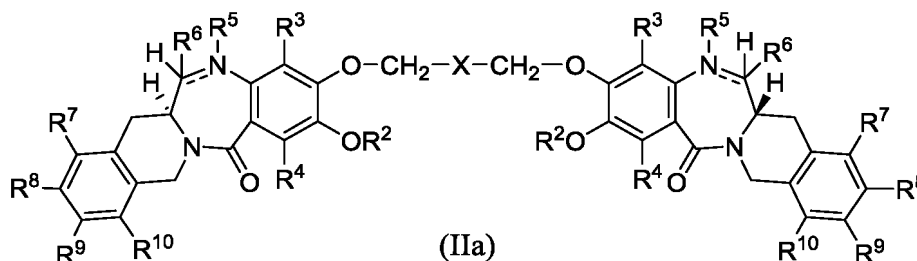
(i) El resto  $(CH_2)_{0-5}X^2$  en el grupo de unión



15

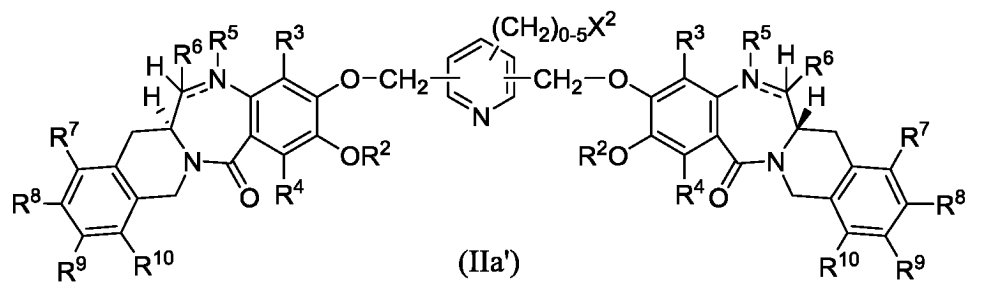
preferentemente es H, OH, OMe, Me o  $CH_2OH$ .

20 Un dímero de la presente invención puede ser un dímero THIQ-THIQ; es decir, en la fórmula (I)  $R^1$  es de acuerdo con la fórmula (Ia). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIa)

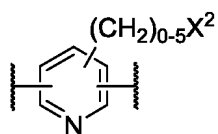


25 en la que X,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ , la línea doble  $\equiv$  y  $X^2$  son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

30 Los dímeros THIQ-THIQ preferidos de acuerdo con la fórmula (IIa) tienen una estructura representada por la fórmula (IIa'), donde las variables en la fórmula (IIa') son como se han definido anteriormente con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento:

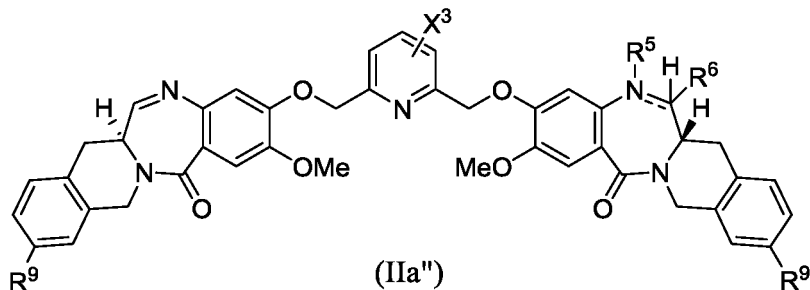


35 Es decir, la fórmula (IIa') difiere de la fórmula (IIa) en que X es



En otra realización preferida de acuerdo con la fórmula (IIa), los dímeros THIQ-THIQ se representan por la fórmula (IIa'')

5



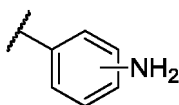
en la que

10  $R^5$  es H si la línea doble al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace;

$R^6$  es H si la línea doble al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace;

15

cada  $R^9$  es independientemente H, OH, OMe,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ ,  $OCH_2CH_2OH$  o

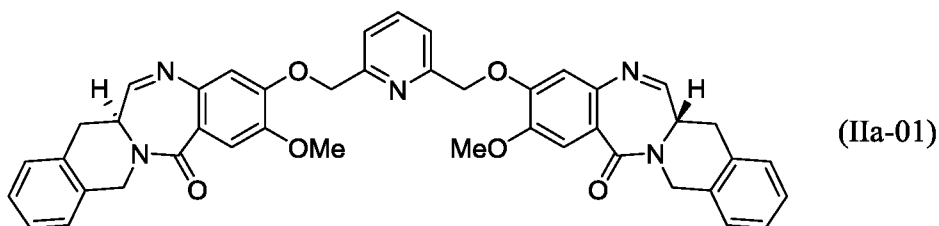


(especialmente el *para*-isómero); y

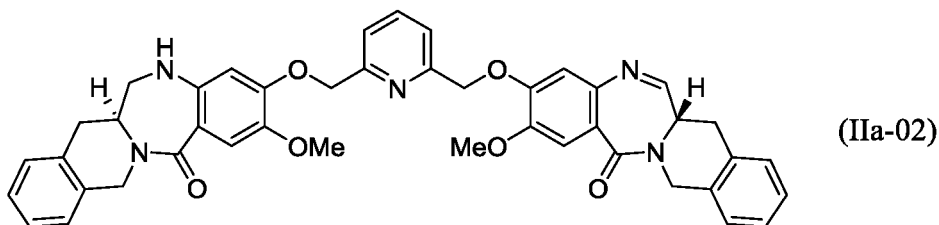
$X^3$  es H, OH, OMe, Me,  $CH_2OH$ , O(alilo), Cl o  $CO_2Me$ .

20

Los ejemplos específicos de dímeros THIQ-THIQ incluyen:

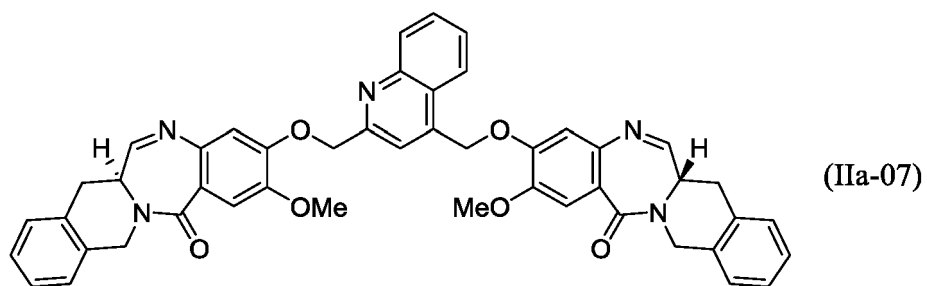
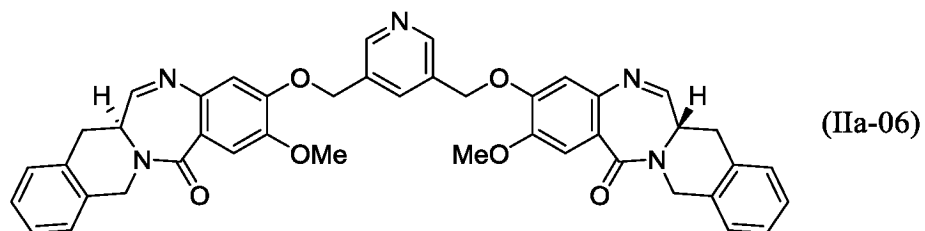
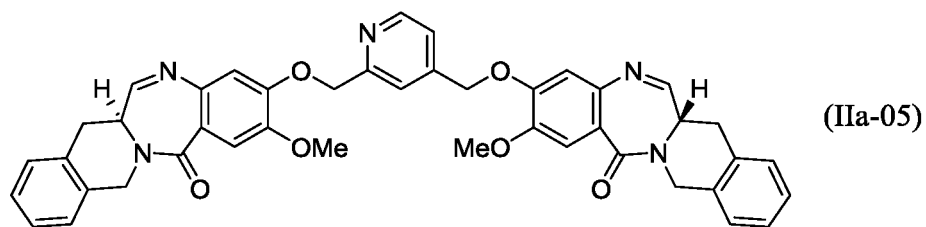
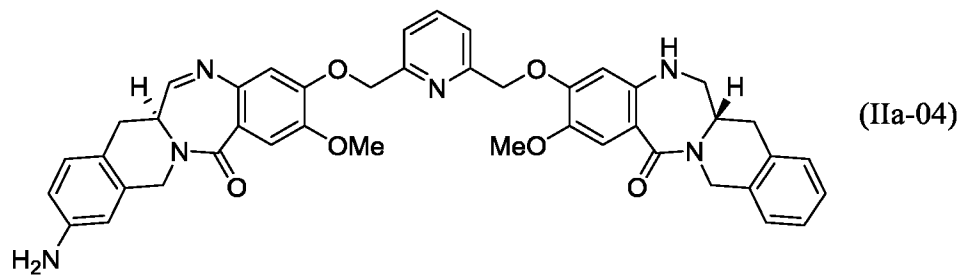
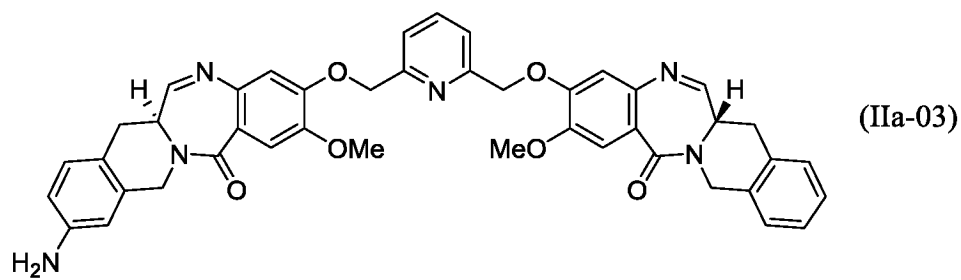


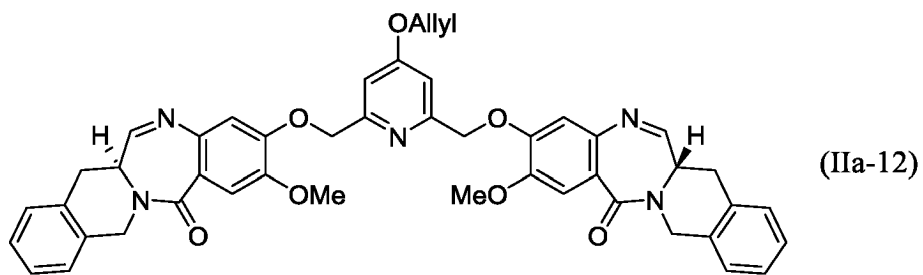
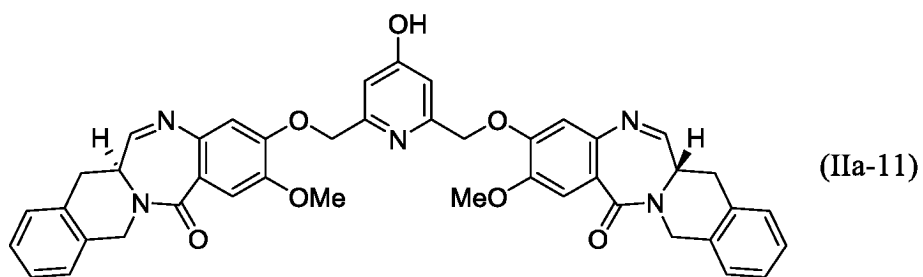
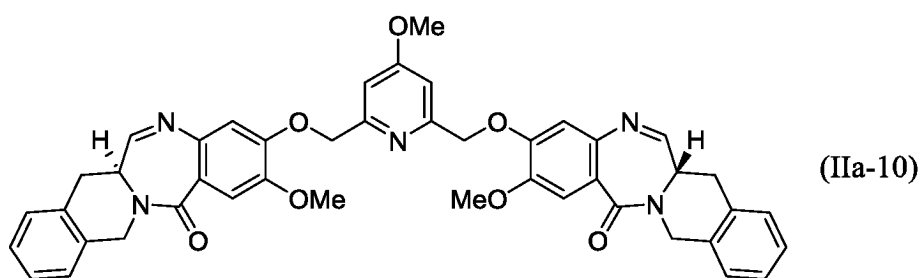
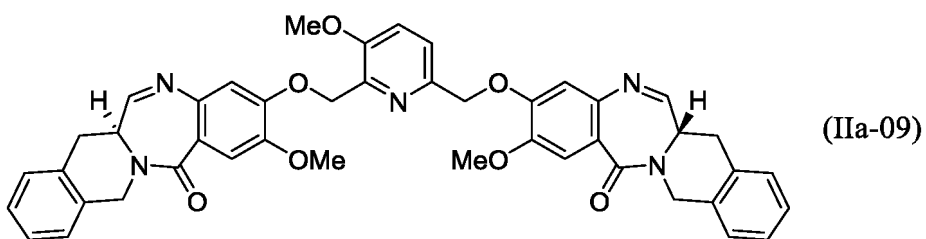
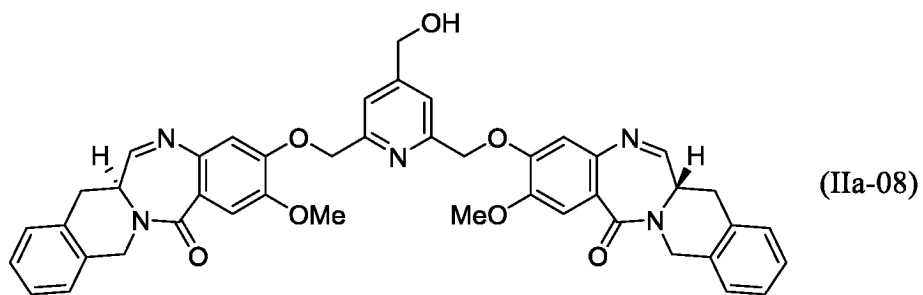
(IIa-01)

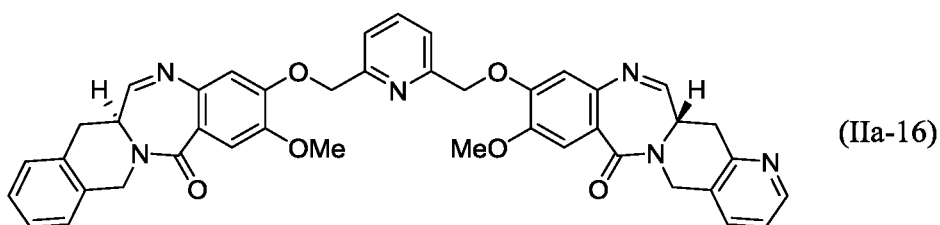
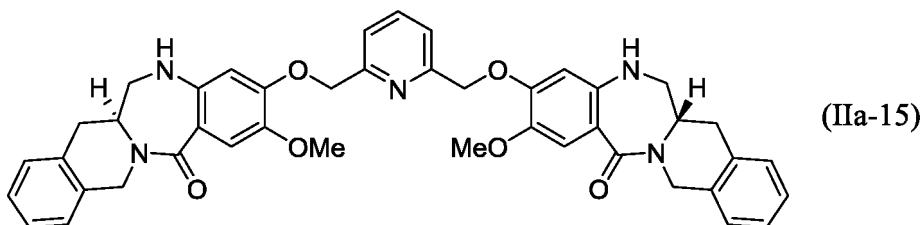
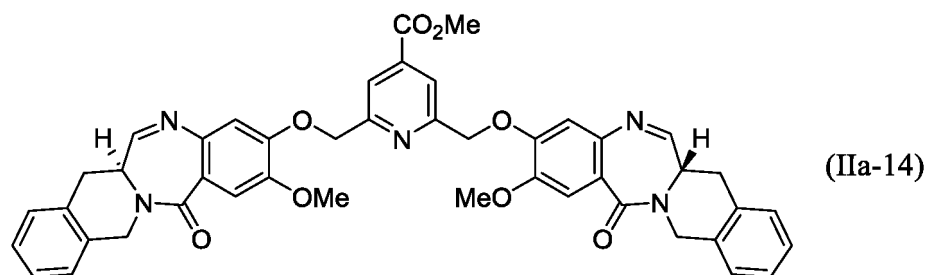
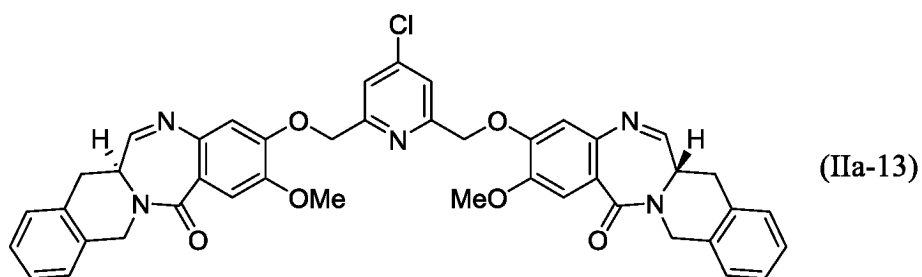


(IIa-02)

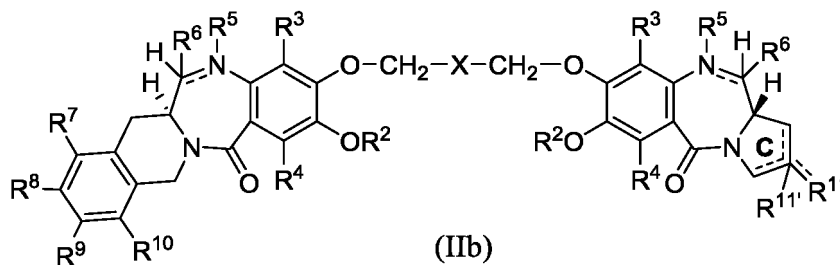
25







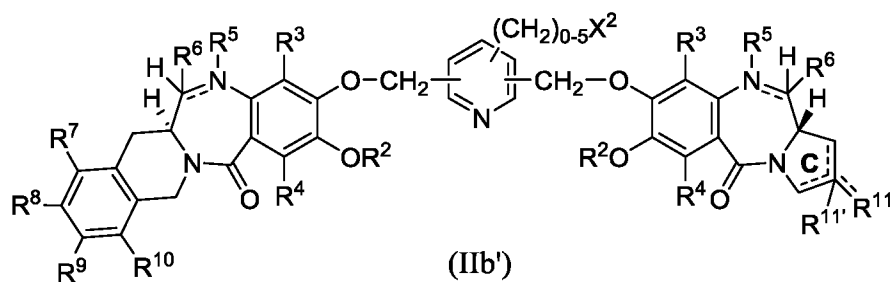
En otra realización, un dímero de la presente invención es un dímero THIQ-PBD; es decir, en la fórmula (I), R<sup>1</sup> es de acuerdo con la fórmula (Ib). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIb):



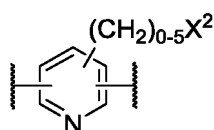
en la que

X, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>11'</sup>, la línea doble  $\text{=}$ , las líneas de puntos en el anillo C y X<sup>2</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

Un dímero THIQ-PBD preferido de acuerdo con la fórmula (IIb) tiene una estructura representada por la fórmula (IIb'), en la que las variables en la fórmula (IIb') son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

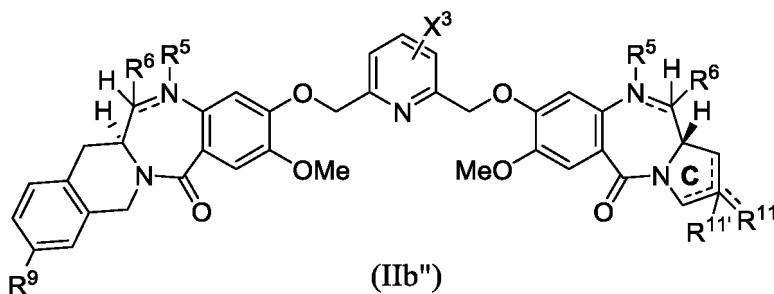


Es decir, la fórmula (IIb') difiere de la fórmula (IIb) en que X es



5

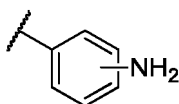
Otro dímero THIQ-PBD preferido de acuerdo con la fórmula (IIb) se representa por la fórmula (IIb''):



10

en la que

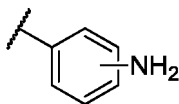
R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o



15

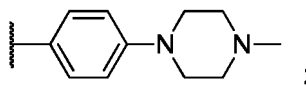
(especialmente el *para*-isómero);

R<sup>11</sup> es H, =CH<sub>2</sub>, CH=CHMe, =CHMe, C≡CCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,



20

(especialmente el *para*-isómero) o



25

R<sup>11'</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11'</sup> y de lo contrario es H;

X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;

al menos una de las líneas dobles en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;

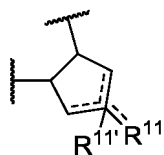
R<sup>5</sup> es H si la línea doble al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace; y

30

R<sup>6</sup> es H si la línea doble al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace.

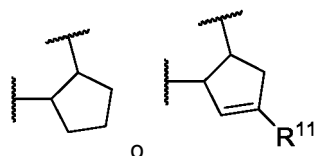
Preferentemente, en la fórmula (IIb), (IIb') y (IIb''),





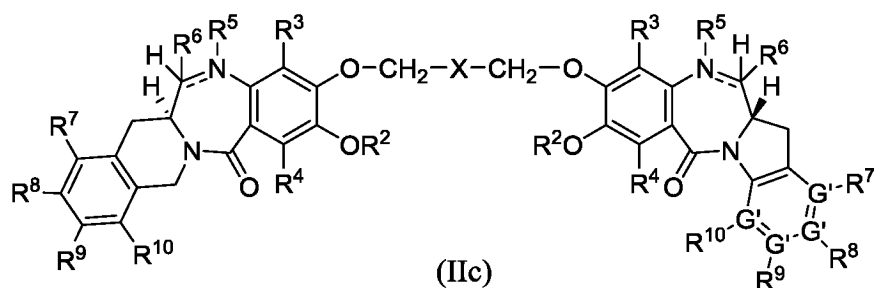
es

5



En otra realización, un dímero de la presente invención comprende una unidad de benzodiazepina que tiene un sistema de anillo de THIQ y una unidad de benzodiazepinas que tiene un sistema de anillo de azaindolina (AZI) ("dímero THIQ-AZI"). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIc):

10



en la que

15

X, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, la línea doble  $\text{---}$  y X<sup>2</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento; un G' es N y los otros son C;

al menos una de las líneas dobles  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;

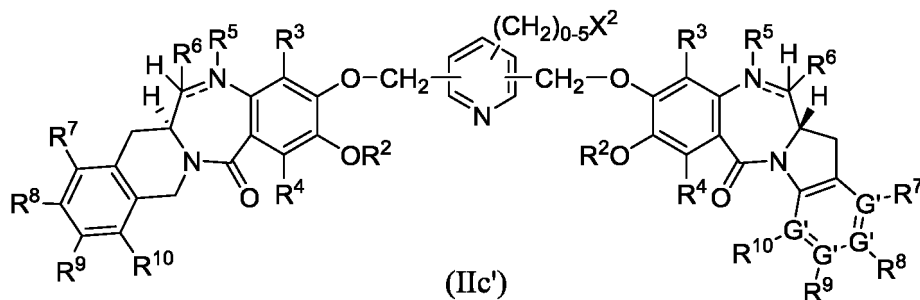
20

R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace.

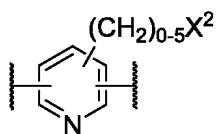
25

Un dímero THIQ-AZI preferido de acuerdo con la fórmula (IIc) tiene una estructura representada por la fórmula (IIc'), en la que las variables son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento



30

es decir, la fórmula (IIc') difiere de la fórmula (IIc) en que X es

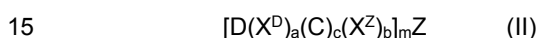


## CONJUGADOS

### 5 General

Los dímeros de la presente invención pueden usarse como agentes terapéuticos por sí mismos, pero preferentemente se usan como conjugados con un resto de direccionamiento que se une específicamente o preferentemente a una entidad química en una célula cancerosa. Preferentemente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo y la entidad química es un antígeno asociado a tumor.

Por tanto, otra realización de la presente invención es un conjugado que comprende dímero de la presente invención y un ligando, representado por la fórmula (II)



donde Z es un ligando, D es un dímero de la presente invención y  $-(X^D)_a C(X^Z)_b-$  se denominan colectivamente "resto enlazador" o "enlazador" porque enlazan Z y D. Dentro del enlazador, C es un grupo escindible diseñado para que se escinda en o cerca del sitio de la acción biológica prevista del dímero D;  $X^D$  y  $X^Z$  se denominan restos espaciadores (o "espaciadores") porque separan D y C y C y Z, respectivamente; los subíndices a, b y c son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de  $X^D$ ,  $X^Z$  y C es opcional). El subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 1, 2, 3 o 4). D,  $X^D$ , C,  $X^Z$  y Z se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

El ligando Z, por ejemplo, un anticuerpo, realiza una función de direccionamiento. Mediante la unión a un tejido o célula diana donde se ubica su antígeno o receptor, el ligando Z se dirige al conjugado allí. (Cuando el ligando Z es un anticuerpo, el conjugado a veces se denomina conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) o inmunoconjugado. Preferentemente, el tejido o célula diana es un tejido canceroso o célula cancerosa y el antígeno o receptor es un antígeno asociado a tumor, es decir, un antígeno que se expresa exclusivamente por las células cancerosas o se sobreexpresa por las células cancerosas, en comparación con las células no cancerosas. La escisión del grupo C en el tejido o célula diana libera el dímero D para que ejerza su efecto citotóxico localmente. En algunos casos, el conjugado se internaliza en una célula diana por endocitosis y la escisión se realiza dentro de la célula diana. De esta manera, se consigue la entrega precisa del dímero D en el sitio de la acción prevista, reduciendo la dosis necesaria. Además, el dímero D normalmente es biológicamente inactivo (o significativamente menos activo) en su estado conjugado, reduciendo de este modo la toxicidad no deseada contra el tejido o las células no diana. Como los fármacos antineoplásicos con frecuencia son altamente tóxicos para las células en general, este es un factor importante a tener en cuenta.

Como se refleja por el subíndice m, cada molécula de ligando Z puede conjugarse con más de un dímero D, dependiendo del número de sitios que el ligando Z tenga disponibles para la conjugación y de las condiciones experimentales que se empleen. Los expertos en la materia apreciarán que, aunque cada molécula individual de ligando Z se conjuga con un número entero de dímeros D, una preparación del conjugado puede analizarse para determinar una relación no entera de dímeros D con respecto al ligando Z, reflejando un promedio estadístico. Esta relación se denomina la relación de sustitución (RS) o, de forma sinónima, la relación fármaco-anticuerpo (RFA).

### 45 Ligando Z

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo. Por comodidad y brevedad y no a modo de limitación, el análisis detallado posterior en el presente documento acerca de la conjugación del ligando Z se escribe en el contexto de que es un anticuerpo, pero los expertos en la materia comprenderán que pueden conjugarse otros tipos de ligando Z, haciendo los cambios necesarios. Por ejemplo, conjugados con ácido fólico ya que el ligando puede dirigirse a las células diana que tienen el receptor de folato en sus superficies (Leamon et al., *Cancer Res.* 2008, 68 (23), 9839). Por la misma razón, el análisis detallado a continuación se escribe principalmente en términos de una relación 1:1 de anticuerpo Z con respecto a análogo D ( $m = 1$ ).

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumor, lo que permite el direccionamiento selectivo a las células cancerosas. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen: mesotelina, antígeno prostático específico de membrana (APEM), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina cinasa 7 (PTK7), glipicano-3, RG1, fucosil-GM1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. El anticuerpo es preferentemente monoclonal, especialmente un anticuerpo humano monoclonal. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente se desvela en Korman et al.,

documento US 8.609.816 B2 (2013; B7H4, también conocido como 08E; en particular los anticuerpos 2A7, 1G11 y 2F9); Rao-Naik et al., documento 8.097.703 B2 (2012; CD19; en particular los anticuerpos 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 y 3C10); King et al., documento US 8.481.683 B2 (2013; CD22; en particular los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6); Keler et al., documento US 7.387.776 B2 (2008; CD30; en particular los anticuerpos 5F11, 2H9 y 17G1); Terrett et al., documento US 8.124.738 B2 (2012; CD70; en particular los anticuerpos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7); Korman et al., documento US 6.984.720 B1 (2006; CTLA-4; en particular los anticuerpos 10D1, 4B6 y 1E2); Vistica et al., documento US 8.383.118 B2 (2013, fucosil-GM1, en particular los anticuerpos 5B1, 5B1a, 7D4, 7E4, 13B8 y 18D5) Korman et al., documento US 8.008.449 B2 (2011; PD-1; en particular los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4); Huang et al., documento US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, en particular los anticuerpos 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli et al., documento US 7.875.278 B2 (2011; PSMA; en particular los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3); Terrett et al., documento US 8.222.375 B2 (2012; PTK7; en particular los anticuerpos 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a y 7C8); Terrett et al., documento US 8.680.247 B2 (2014; glipecano-3; en particular los anticuerpos 4A6, 11E7 y 16D10); Harkins et al., documento US 7.335.748 B2 (2008; RG1; en particular los anticuerpos A, B, C y D); Terrett et al., documento US 8.268.970 B2 (2012; mesotelina; en particular los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1); Xu et al., documento US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; en particular los anticuerpos 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 y 1A9.A6.B9); Deshpande et al., documento US 8.258.266 B2 (2012; IP10; en particular los anticuerpos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S y 13C4); Kuhne et al., documento US 8.450.464 B2 (2013; CXCR4; en particular los anticuerpos F7, F9, D1 y E2); y Korman et al., documento US 7.943.743 B2 (2011; PD-L1; en particular los anticuerpos 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4. Cada uno de los anticuerpos anteriormente mencionados puede usarse en un CAF con un dímero de la presente invención.

El ligando Z también puede ser un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o un mimético de anticuerpo, tal como un Affibody, un anticuerpo de dominio (dAb), un nanocuerpo, un unicuerpo, una DARPin, una anticalina, un versacuerpo, una duocalina, una lipocalina o un avímero.

Uno cualquiera de varios grupos reactivos diferentes en el ligando Z puede ser un sitio de conjugación, incluyendo grupos  $\epsilon$ -amino en restos de lisina, restos de hidrato de carbono colgantes, grupos ácido carboxílico, grupos disulfuro y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa una contraposición, que tiene algunas ventajas y algunas desventajas. Para obtener revisiones sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para la conjugación, véase, por ejemplo, Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001), 171-216 y Dubowchik y Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123.

En una realización, el ligando Z se conjuga a través de un grupo  $\epsilon$ -amino de lisina. La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, que pueden conjugarse a través de enlaces amida, urea, tiourea o carbamato usando técnicas conocidas en la materia. Sin embargo, es difícil controlar qué grupos  $\epsilon$ -amino y cuántos reaccionan, lo que conduce a una variabilidad potencial de lote a lote en las preparaciones de conjugados. Además, la conjugación puede provocar la neutralización de un grupo  $\epsilon$ -amino protonado importante para mantener la conformación nativa del anticuerpo o puede tener lugar en una lisina cercana o en un ligando o sitio de unión a antígeno, lo que no es deseable.

En otra realización, el ligando Z puede conjugarse a través de una cadena lateral de hidrato de carbono, ya que muchos anticuerpos están glucosilados. La cadena lateral de hidrato de carbono puede oxidarse con peryodato para generar grupos aldehído, que a su vez pueden hacerse reaccionar con aminas para formar un grupo imina, tal como en una semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina puede convertirse en un grupo amina más estable mediante reducción con  $\text{NaCNBH}_3$ . Para obtener divulgaciones adicionales acerca de la conjugación a través de cadenas laterales de hidrato de carbono, véase, por ejemplo, Rodwell et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83, 2632-2636 (1986). Al igual que con los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, existen preocupaciones con respecto a la reproducibilidad de la ubicación del sitio o sitios de conjugación y la estequiometría.

En otra realización más, el ligando Z puede conjugarse a través de un grupo ácido carboxílico, tal como el carboxilo de cadena lateral de un ácido glutámico o aspártico. En una realización, un grupo ácido carboxílico terminal se funcionaliza para generar una carbohidrazida, que después se hace reaccionar con un resto de conjugación que lleva aldehído. Véase Fisch et al., *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 147-153.

En otra realización más, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de un grupo disulfuro que une un resto cisteína en el anticuerpo Z y un azufre en la otra porción del conjugado. Algunos anticuerpos carecen de grupos tiol (sulfhidrilo) libres pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo, en la región bisagra. En dicho caso, pueden generarse grupos tiol libres mediante la reducción de grupos disulfuro nativos. Los grupos tiol generados de este modo pueden usarse para la conjugación. Véase, por ejemplo, Packard et al., *Biochemistry* 1986, 25, 3548-3552; King et al., *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994); y Doronina et al., *Nature Biotechnol.* 21 (7), 778-784 (2003). Nuevamente, existen preocupaciones con respecto a la ubicación del sitio de conjugación y la estequiometría y la posible alteración de la conformación nativa del anticuerpo.

Se conocen varios métodos para introducir grupos tiol libres en anticuerpos sin romper los enlaces disulfuro nativos, métodos que pueden ponerse en práctica con un ligando Z de la presente invención. Dependiendo del método

empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfhidrilos libres en ubicaciones predeterminadas. En un enfoque, se preparan anticuerpos mutados en los que una cisteína se sustituye por otro aminoácido. Véase, por ejemplo, Eigenbrot et al., documento US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti et al., *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507; Urnovitz et al., documento US 4.698.420 (1987); Stimmel et al., *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam et al., documento US 7.311.902 B2 (2007); Kuan et al., *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon et al., *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995). En otro enfoque, se añade una cisteína adicional al extremo C terminal. Véase, por ejemplo, Cumber et al., *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992); King et al., *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994); Li et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002); Yang et al., *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003); y Olafson et al., *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004). Liu et al. enseña un método preferido para introducir cisteínas libres, el documento 8.865.875 B2 (2014), en el que se añade una secuencia de aminoácidos que lleva cisteína al extremo C terminal de la cadena pesada de un anticuerpo. Este método introduce un número conocido de restos de cisteína (uno por cadena pesada) en una ubicación distante del sitio de unión a antígeno.

En otra realización más, los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina pueden modificarse con reactivos tales como 2-iminotiolano, 2-iminotiociclohexano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), convirtiendo un grupo  $\epsilon$ -amino en un grupo tiol o disulfuro, creando un sustituto de cisteína, por así decirlo. Sin embargo, este método tiene las mismas limitaciones de ubicación de conjugación y de estequiometría asociadas a los grupos  $\epsilon$ -amino propiamente dichos.

#### Componentes enlazadores

Como se ha indicado anteriormente, la porción enlazadora de un conjugado de la presente invención comprende hasta tres elementos: un grupo escindible C y separadores opcionales  $X^Z$  y  $X^D$ .

El grupo escindible C es un grupo escindible en condiciones fisiológicas, seleccionado preferentemente de manera que sea relativamente estable mientras el conjugado esté en la circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinda fácilmente una vez que el conjugado alcance su sitio de la acción prevista, es decir, cerca, en o dentro de la célula diana. Preferentemente, el conjugado es internalizado por una célula diana tras la unión del anticuerpo Z a un antígeno presentado en la superficie de la célula diana. Posteriormente, la escisión del grupo C se produce en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

En una realización, el grupo C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo está ligeramente por encima de neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, de aproximadamente 5. Por tanto, un grupo C cuya escisión es catalizada por ácido se escindirán a una velocidad varios órdenes de magnitud más rápida dentro de un lisosoma que la velocidad en el plasma sanguíneo. Los ejemplos de grupos sensibles al ácido adecuados incluyen cis-aconitilamidas e hidrazonas, como se describe en Shen et al., documento US 4.631.190 (1986); Shen et al., documento US 5.144.011 (1992); Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) e Yang et al., *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988).

En otra realización, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros pueden escindirarse mediante un mecanismo de intercambio de tiol-disulfuro, a una velocidad que depende de la concentración de tiol ambiental. Como la concentración intracelular de glutatión y otros tioles es superior a sus concentraciones séricas, la velocidad de escisión de un disulfuro será mayor intracelularmente. Adicionalmente, la velocidad de intercambio de tiol-disulfuro puede modularse mediante el ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un alquil-aril disulfuro frente a un alquil-alquil disulfuro; sustitución en el anillo de arilo, etc.), permitiendo el diseño de enlaces disulfuro que tienen una estabilidad en suero potenciada o una velocidad de escisión particular. Para obtener divulgaciones adicionales relacionadas con grupos disulfuro escindibles en conjugados, véase, por ejemplo, Thorpe et al., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi et al., documento US 7.541.530 B2 (2009); Ng et al., documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., documento WO 2002/096910 A1; Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; y Sufi et al., documento US 2010/0145 036 A1.

Un grupo escindible preferido es un péptido que es escindido selectivamente por una proteasa dentro de la célula diana, a diferencia de una proteasa en el suero. Normalmente, un grupo peptídico escindible comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente de 1 a 6 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 3 aminoácidos. El aminoácido o aminoácidos pueden ser  $\alpha$ -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos derivados de los mismos, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. En este contexto, el término "aminoácido" también incluye análogos y miméticos de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general  $H_2N(R)CHCO_2H$  de un aminoácido natural, excepto porque el grupo R no es uno que se encuentra entre los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina metil sulfonio. Un mimético de aminoácido es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un  $\alpha$ -aminoácido pero funciona de manera similar a uno. El aminoácido puede tener la estereoquímica "L" de los aminoácidos codificados genéticamente, así como la estereoquímica enantiomérica "D".

Preferentemente, el grupo C contiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa. Se conocen en la técnica muchas secuencias de reconocimiento de escisión. Véase, por ejemplo, Matayoshi et al. *Science* 247: 954 (1990); Dunn et al. *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah et al. *Meth.*

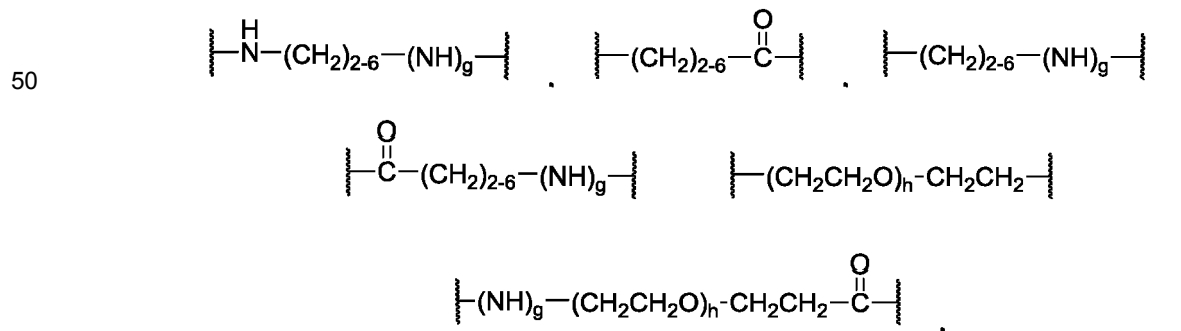
*Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber et al. *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith et al. *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); y Bouvier et al. *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995).

- 5 Para los conjugados que no tienen por objeto ser internalizados por una célula, puede elegirse un grupo C de manera que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular en la vecindad del tejido diana, por ejemplo, una proteasa liberada por células próximas a morir cercanas o una proteasa asociada a tumor. Son ejemplos de proteasas extracelulares asociadas a tumor son metaloproteasas de matriz (MMP), oligopeptidasa thimet (TOP) y CD10.
- 10 Para los conjugados que se diseñan para ser internalizados por una célula, el grupo C comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosómica o lisosómica, especialmente la última. Los ejemplos no limitantes de dichas proteasas incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente catepsina B. La catepsina B escinde preferentemente péptidos en una secuencia -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- donde AA<sup>1</sup> es un aminoácido básico o de enlace de hidrógeno fuerte (tal como lisina, arginina o citrulina) y AA<sup>2</sup> es un aminoácido hidrófobo (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina), por ejemplo, Val-Cit (donde Cit denota citrulina) o Val-Lys. (En el presente documento, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección de N a C, como en H<sub>2</sub>N-AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>-CO<sub>2</sub>H, a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit y Asp-Val-Cit también son motivos peptídicos de sustrato para la catepsina B, aunque en algunos casos la tasa de escisión puede ser más lenta. Para obtener información adicional acerca de los grupos escindibles con catepsina, véase Dubowchik et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002). Otra enzima que puede utilizarse para escindir enlaces peptídicos es la legumaina, una cisteína proteasa lisosómica que escinde preferentemente en Ala-Ala-Asn.
- 25 En una realización, el Grupo C es un péptido que comprende una secuencia de dos aminoácidos -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- en la que AA<sup>1</sup> es lisina, arginina o citrulina y AA<sup>2</sup> es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra realización, C consiste en una secuencia de uno a tres aminoácidos, seleccionados entre el grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser y Glu.
- 30 La preparación y el diseño de grupos escindibles C que consisten en un solo aminoácido se desvelan en Chen et al., documento US 8.664.407 B2 (2014).

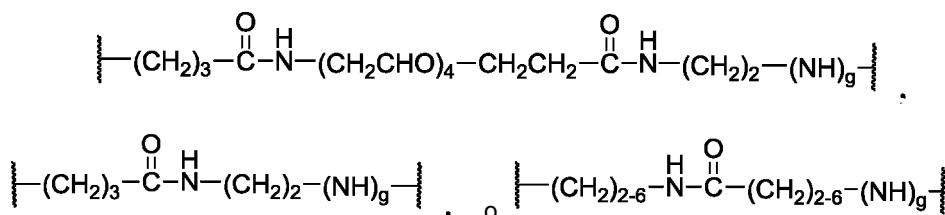
El grupo C también puede ser fotoescindible, por ejemplo, un nitrobenzil éter que se escinde tras la exposición a la luz.

- 35 El grupo C puede unirse directamente al anticuerpo Z o el análogo D; es decir, los espaciadores X<sup>Z</sup> y X<sup>D</sup>, según el caso, pueden estar ausentes. Por ejemplo, si el grupo C es un disulfuro, uno de los dos azufres puede ser un resto cisteína o su sustituto en el anticuerpo Z. O, el grupo C puede ser una hidrazona unida a un aldehído en una cadena lateral de hidrato de carbono del anticuerpo. O, el grupo C puede ser un enlace peptídico formado con un grupo ε-amino de lisina del anticuerpo Z. En una realización preferida, el dímero D se une directamente al grupo C a través de un enlace peptídico a un grupo carboxilo o amina en el dímero D.
- 40

45 Cuando está presente, el espaciador X<sup>Z</sup> proporciona una separación espacial entre el grupo C y el anticuerpo Z, para que el primero no interfiera estéricamente con la unión del antígeno por este último o que este último no interfiera estéricamente con la escisión del primero. Adicionalmente, el espaciador X<sup>Z</sup> puede usarse para conferir una solubilidad aumentada o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X<sup>Z</sup> puede comprender uno o más segmentos modulares, que pueden ensamblarse en cualquier número de combinaciones. Son ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X<sup>Z</sup>:



- 55 y combinaciones de los mismos, donde el subíndice g es 0 o 1 y el subíndice h es de 1 a 24, preferentemente de 2 a 4. Estos segmentos pueden combinarse, tal como se ilustra a continuación:



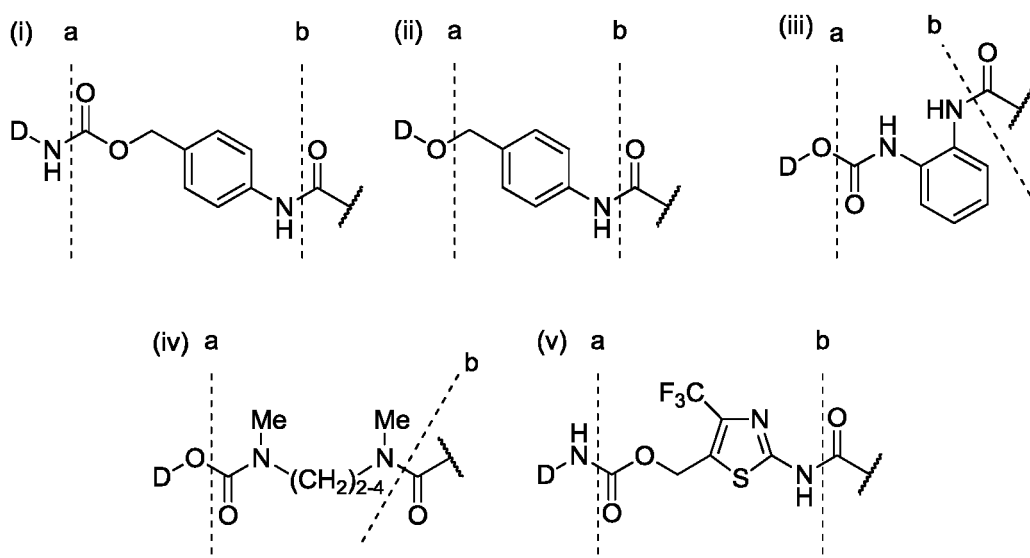
5 El espaciador X<sup>D</sup>, si está presente, proporciona una separación espacial entre el grupo C y el dímero D, para que este último no interfiera estérica o electrónicamente con la escisión del primero. El espaciador X<sup>D</sup> también puede servir para introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en un conjugado. Generalmente, la masa y funcionalidad adicionales afectarán a la semivida en suero y otras propiedades del conjugado. Por tanto, a través de una selección con buen criterio de grupos espaciadores, puede modularse la semivida en suero de un conjugado. El espaciador X<sup>D</sup> también puede ensamblarse a partir de segmentos modulares, como se ha descrito anteriormente en el contexto del espaciador X<sup>Z</sup>.

15 Los espaciadores X<sup>Z</sup> y/o X<sup>D</sup>, cuando están presentes, proporcionan preferentemente una separación lineal de 4 a 25 átomos, más preferentemente de 4 a 20 átomos, entre Z y C o D y C, respectivamente.

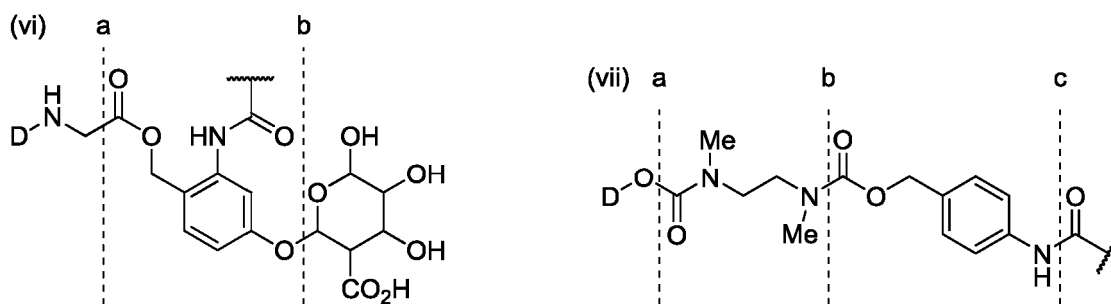
El enlazador puede realizar otras funciones además de unir covalentemente el anticuerpo y el fármaco. Por ejemplo, el enlazador puede contener grupos poli(etilenglicol) (PEG), que potencian la solubilidad ya sea durante la realización de la química de conjugación o en el producto CAF final. Cuando hay presente un grupo PEG, puede incorporarse en el espaciador X<sup>Z</sup> de X<sup>D</sup> o en ambos. El número de unidades de repetición en un grupo PEG puede ser de 2 a 20, preferentemente de entre 4 y 10.

25 El espaciador X<sup>Z</sup> o X<sup>D</sup>, o ambos, pueden comprender un resto autoinmolante. Un resto autoinmolante es un resto que (1) está unido al grupo C y ya sea el anticuerpo Z o el dímero D y (2) tiene una estructura de manera que la escisión del grupo C inicie una secuencia de reacción que dé como resultado que el resto autoinmolante se desuna del anticuerpo Z o el dímero D, según el caso. En otras palabras, la reacción en un sitio distal del anticuerpo Z o el dímero D (escisión del grupo C) provoca que el enlace X<sup>Z</sup>-Z o X<sup>D</sup>-D también se rompa. La presencia de un resto autoinmolante es deseable en el caso del espaciador X<sup>D</sup> porque, si, después de la escisión del conjugado, el espaciador X<sup>D</sup> o una porción del mismo permaneciera unido al dímero D, la actividad biológica de este último podría verse alterada. El uso de un resto autoinmolante es especialmente deseable cuando el grupo escindible C es un polipéptido, en cuyo caso el resto autoinmolante normalmente se ubica adyacente al mismo.

A continuación se muestran restos autoinmolantes (i)-(vii) de ejemplo unidos a un grupo hidroxilo o amino en una molécula D compañera:



35

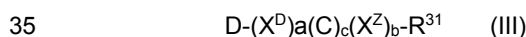


El resto autoinmolante es la estructura entre las líneas de puntos a y b (o las líneas de puntos b y c), con características estructurales adyacentes que se muestran para proporcionar contexto. Los restos autoinmolantes (i) y (v) están unidos a un dímero D-NH<sub>2</sub> (es decir, el dímero D se conjuga a través de un grupo amino), mientras que los restos autoinmolantes (ii), (iii) y (iv) están unidos a un dímero D-OH (es decir, el dímero D se conjuga a través de un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace de amida en la línea de puntos b (por ejemplo, por una peptidasa) libera el nitrógeno de amida como nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacción que da como resultado la escisión del enlace en la línea de puntos a y la consiguiente liberación de D-OH o D-NH<sub>2</sub>, según el caso. Como alternativa, la escisión que desencadena la reacción de autoinmolación puede ser por un tipo diferente de enzima, por ejemplo, por una β-glucuronidasa, como en el caso de la estructura (vi). En algunos casos, los grupos autoinmolantes pueden usarse en tándem, como se muestra en la estructura (vii). En dicho caso, la escisión en la línea de puntos c desencadena la autoinmolación del resto entre las líneas de puntos b y c mediante una reacción de eliminación 1,6, seguida de la autoinmolación del resto entre las líneas de puntos a y b mediante una reacción de ciclación-eliminación. Para obtener divulgaciones adicionales con respecto a restos autoinmolantes, véase Carl et al., *J. Med. Chem.*, 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., documento WO 81/01145 (1981); Dubowchik et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999); Firestone et al., documento US 6.214.345 B1 (2001); Toki et al., *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (fe de erratas, p. 941); Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Sufi et al., documento WO 2008/083312 A2; Feng, documento US 7.375.078 B2; Jeffrey et al., documento US 8.039.273; y Senter et al., documento US 2003/0096743 A1. Un grupo autoinmolante preferido es el grupo p-aminobencil oxycarbonilo (PABC), como se muestra en la estructura (i).

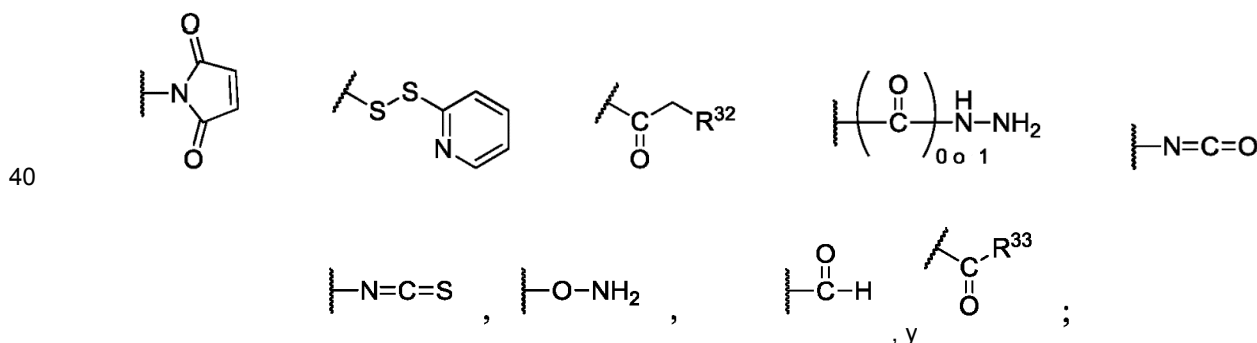
En otra realización, un resto de direccionamiento de anticuerpo y el dímero D se unen mediante un enlazador no escindible, es decir, el elemento C está ausente. La degradación del anticuerpo en última instancia reduce el enlazador a un pequeño resto adjunto que no interfiere con la actividad biológica del dímero D.

*Técnicas de conjugación*

Los conjugados de la presente invención se preparan preferentemente preparando en primer lugar un compuesto que comprende un análogo de la presente invención (representado por D en las fórmulas a continuación) y un enlazador (X<sup>D</sup>)<sub>a</sub>(C)<sub>c</sub>(X<sup>Z</sup>)<sub>b</sub> (donde X<sup>D</sup>, C, X<sup>Z</sup>, a, b y c son como se definen para la fórmula (II)) para formar una composición análogo-enlazador representada por la fórmula (III):



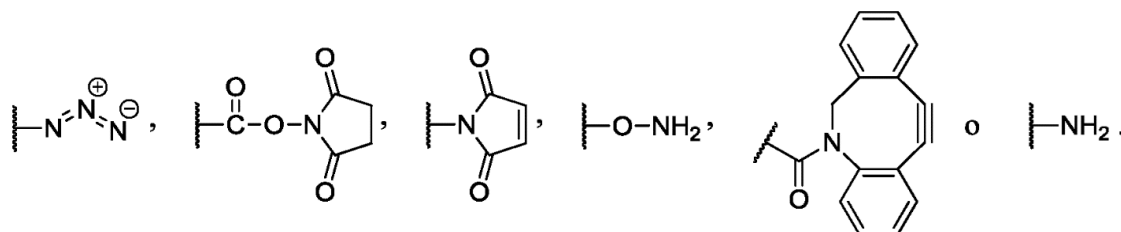
donde R<sup>31</sup> es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo Z para formar el conjugado. Los ejemplos de grupos R<sup>31</sup> adecuados incluyen amino, azida, tiol, ciclooctino,



donde R<sup>32</sup> es Cl, Br, F, mesilato o tosilato y R<sup>33</sup> es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimidilo, -O-(4-nitrofenilo), -O-

pentafluorofenilo u -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente utilizable para la preparación de restos adecuados  $D-(X^D)_aC(X^Z)_b-R^{31}$  se desvela en Ng et al., documento US 7.087.600 B2 (2006); Ng et al., documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., documento US 7.129.261 B2 (2006); Ng et al., documento WO 02/096910 A1; Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; Chen et al., documento US 7.517.903 B2 (2009); Gangwar et al., documento US 7.714.016 B2 (2010); Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Gangwar et al., documento US 7.847.105 B2 (2010); Gangwar et al., documento US 7.968.586 B2 (2011); Sufi et al., documento US 2010/0145036 A1; y Chen et al., documento US 2010/0113476 A1.

Preferentemente, el grupo funcional reactivo  $-R^{31}$  es  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SH$ , maleimido, ciclooctino, azido ( $-N_3$ ), hidroxilamino ( $-ONH_2$ ) o N-hidroxisuccinimido. Son grupos funcionales especialmente preferidos  $-R^{31}$ :



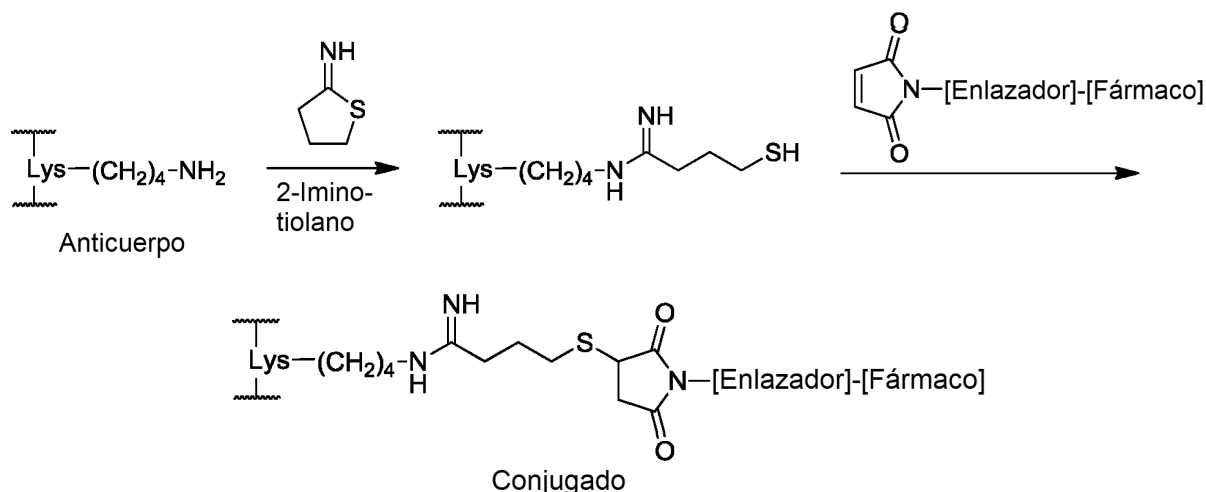
Un grupo  $-OH$  puede esterificarse con un grupo carboxi en el anticuerpo, por ejemplo, en una cadena lateral de ácido aspártico o glutámico.

Un grupo  $-CO_2H$  puede esterificarse con un grupo  $-OH$  o amidarse con un grupo amino (por ejemplo, en una cadena lateral de lisina) en el anticuerpo.

Un grupo N-hidroxisuccinimida es funcionalmente un grupo carboxilo activado y puede amidarse convenientemente por reacción con un grupo amino (por ejemplo, de lisina).

Un grupo maleimida puede conjugarse con un grupo  $-SH$  en el anticuerpo (por ejemplo, de cisteína o de la modificación química del anticuerpo para introducir un grupo funcional sulfhidrilo), en una reacción de adición de Michael. O, la posición de los dos grupos puede invertirse, modificando el anticuerpo para que tenga un grupo maleimida unido y que el compuesto fármaco-enlazador tenga un grupo  $-SH$ .

Diversas técnicas pueden introducir un grupo  $-SH$  en un anticuerpo. En una preferida, un grupo  $\epsilon$ -amino en la cadena lateral de un resto de lisina en el anticuerpo se hace reaccionar con 2-iminotiolano para introducir un grupo tiol libre ( $-SH$ ). El grupo tiol puede reaccionar con una maleimida u otro grupo aceptor de nucleófilos para efectuar la conjugación:



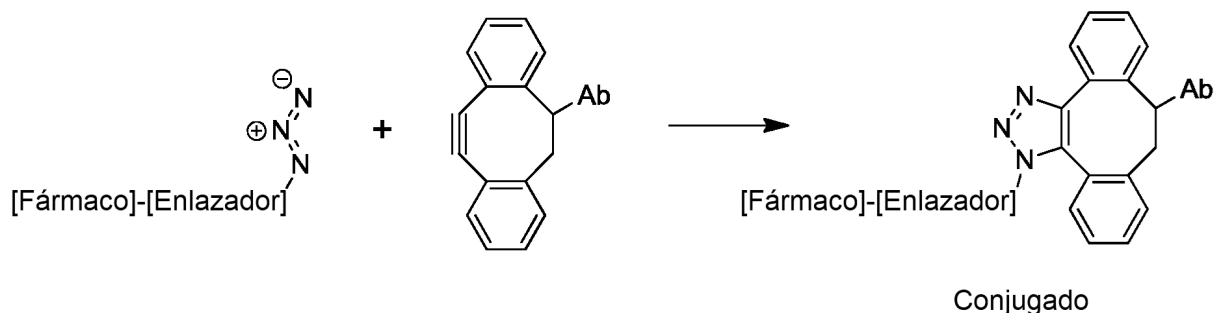
Normalmente, se consigue un nivel de tiolación de dos a tres tioles por anticuerpo. Para obtener un procedimiento representativo, véase Cong et al. 2014. Por tanto, en una realización, un anticuerpo para la conjugación con un dímero de la presente invención tiene uno o más restos lisina (preferentemente dos o tres) modificados por reacción con iminotiolano.

También puede usarse un grupo  $-SH$  para la conjugación donde el anticuerpo se ha modificado para introducir un grupo maleimida al mismo, en una reacción de adición de Michael que es la "imagen especular" de la descrita



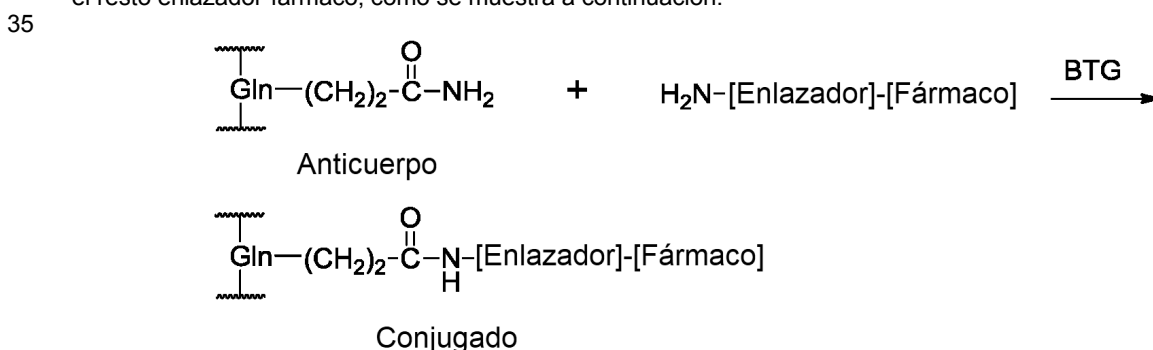
anteriormente. Los anticuerpos pueden modificarse para que tengan grupos maleimida con N-succinimidil 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato (SMCC) o su variante sulfonada sulfo-SMCC, estando ambos reactivos disponibles en Sigma-Aldrich.

- 5 Una técnica de conjugación alternativa emplea una "química clic" sin cobre, en la que un grupo azida se añade a través del enlace alquino tenso de un ciclooctino para formar un anillo de 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 2004, 126, 15046; Best, *Biochemistry* 2009, 48, 6571. La azida puede ubicarse en el anticuerpo y el ciclooctino en el resto farmacológico, o viceversa. Un grupo ciclooctino preferido es dibenzociclooctino (DIBO). Diversos reactivos que tienen un grupo DIBO están disponibles en Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón. La reacción a continuación ilustra la conjugación por química clic para el caso en el que el grupo DIBO está unido al anticuerpo (Ab):



- 15 Otra técnica más de conjugación implica la introducción de un aminoácido no natural en un anticuerpo, proporcionando el aminoácido no natural un grupo funcional para la conjugación con un grupo funcional reactivo en el resto farmacológico. Por ejemplo, el aminoácido no natural p-acetilfenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido, como se enseña en Tian et al., documento WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en la p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación a través de la formación de una oxima con un grupo hidroxilamino en el resto enlazador-fármaco. Como alternativa, el aminoácido no natural p-azidofenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo para proporcionar un grupo funcional azida para la conjugación a través de química clic, como se ha analizado anteriormente. Los aminoácidos no naturales también pueden incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido usando métodos sin células, como se enseña en Goerke et al., documento US 2010/0093024 A1 (2010) y Goerke et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102 (2), 400-416. Por tanto, en una realización, un anticuerpo que se usa para preparar un conjugado con un dímero de la presente invención tiene uno o más aminoácidos reemplazados por un aminoácido no natural, que preferentemente es p-acetilfenilalanina o p-azidofenilalanina, más preferentemente p-acetilfenilalanina.

- 30 Otra técnica de conjugación más usa la enzima transglutaminasa (preferentemente transglutaminasa bacteriana o BTG), según Jeger et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995 ("Jeger"). BTG forma un enlace amida entre la cadena lateral carboxamida de una glutamina (el aceptor de amina) y un grupo alquilenamino (el donador de amina), que puede ser, por ejemplo, el grupo ε-amino de una lisina o un grupo 5-amino-n-pentilo. En una reacción de conjugación habitual, el resto glutamina se ubica en el anticuerpo, mientras que el grupo alquilenamino se ubica en el resto enlazador-fármaco, como se muestra a continuación:



- 40 El posicionamiento de un resto glutamina en una cadena polipeptídica tiene un gran efecto sobre su susceptibilidad a transamidación mediada por BTG. Ninguno de los restos glutamina en un anticuerpo es normalmente sustrato de BTG. Sin embargo, Jeger desvela que si el anticuerpo se desglucosila (siendo el sitio de glucosilación la asparagina 297 (N297)) la glutamina 295 (Q295) cercana se desbloquea y se vuelve reactiva a BTG. Un anticuerpo puede desglucosilarse enzimáticamente mediante tratamiento con PNGasa F (Péptido-N-Glucosidasa F). Como alternativa, un anticuerpo puede sintetizarse sin glucósidos mediante la introducción de una mutación N297A en la región constante, para eliminar el sitio de glucosilación N297. Jeger desvela que una sustitución de N297Q en un

anticuerpo no solo elimina la glucosilación, sino que también introduce un segundo resto glutamina (en la posición 297) que también es un aceptor de amina. Por tanto, en una realización, un anticuerpo que se conjuga con un dímero de la presente invención se desglucosila. En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución N297Q. Los expertos en la materia apreciarán que la desglucosilación por modificación posterior a la síntesis o por la introducción de una mutación N297A genera dos restos glutamina reactivos con BTG por anticuerpo (uno por cadena pesada, en la posición 295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro restos glutamina reactivos con BTG (dos por cadena pesada, en las posiciones 295 y 297). (La numeración de las posiciones de aminoácidos en un anticuerpo es según el índice EU como se establece en Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª ed., Pub. N.º 91-3242, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., NIH, Bethesda, Md., 1991; en lo sucesivo en el presente documento "Kabat").

La conjugación también puede efectuarse usando la enzima Sortasa A, como se enseña en Levary et al., *PLoS One* 2011, 6 (4), e18342; Proft, *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 1-10; Ploegh et al., documento WO 2010/087994 A2 (2010); y Mao et al., documento WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de la Sortasa A (normalmente LPXTG, donde X es cualquier aminoácido natural) puede estar ubicado en el ligando Z y el motivo aceptor nucleófilo (normalmente GGG) puede ser el grupo R<sup>31</sup> en la fórmula (III) o viceversa.

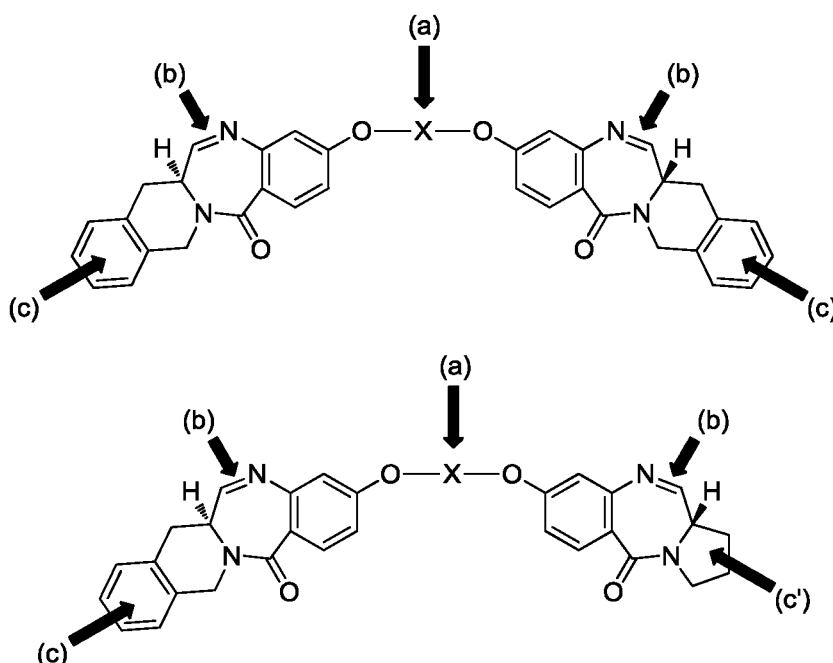
Un anticuerpo también puede adaptarse para la conjugación modificando su grupo glucosilo para introducir un grupo ceto que sirve como sitio de conjugación por formación de oxima, como se enseña por Zhu et al., *mAbs* 2014, 6, 1. En otra variación de la glucoingeniería, puede modificarse un grupo glucosilo de un anticuerpo para introducir un grupo azida para la conjugación mediante "química clic". Véase Huang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 12308 y Wang, documento US 8.900.826 B2 (2014) y documento US 7.807.405 B2 (2010).

Otra técnica de conjugación más puede denominarse en general puente disulfuro: los enlaces disulfuro en un anticuerpo se escinden, creando un par de grupos tiol (-SH). Después, el anticuerpo se trata con un compuesto fármaco-enlazador que contiene dos sitios reactivos con tiol. La reacción de los grupos tiol con los dos sitios produce un nuevo puente que vuelve a crear, de una forma, el puente disulfuro original, conservando de este modo la estructura terciaria del anticuerpo y uniendo un resto fármaco-enlazador. Véase, por ejemplo, Burt et al., documento WO 2013/190292 A2 (2013) y Jackson et al., documento US 2013/0224228 A1 (2013).

#### Compuestos dímero-enlazador

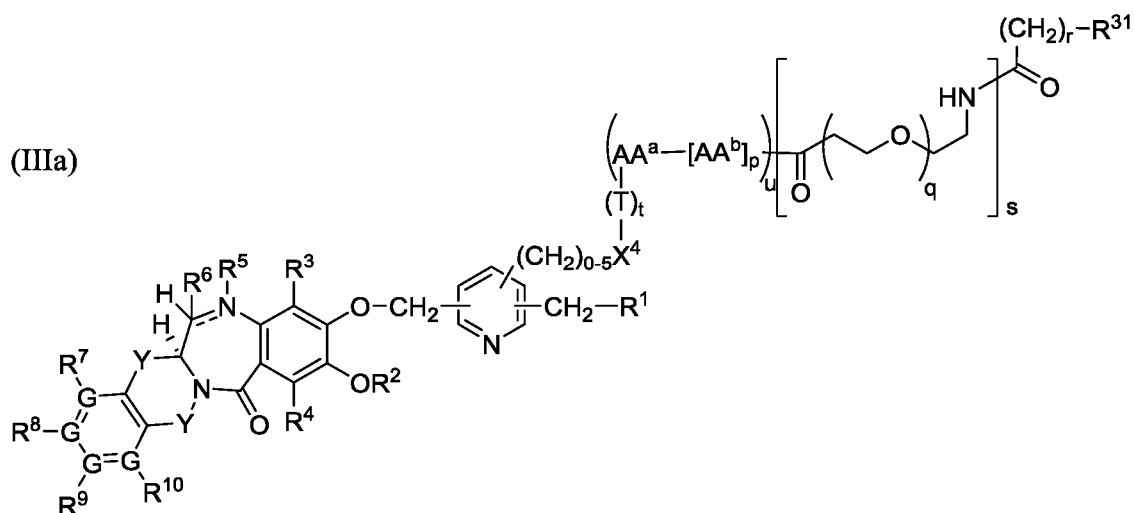
Generalmente, un CAF de un dímero de la presente invención comprende un enlazador unido a un grupo funcional en el dímero, enlazador que está unido al anticuerpo. Como reflejo de la diversidad de técnicas de conjugación disponibles, los dímeros de la presente invención pueden elaborarse en muchos compuestos dímero-enlazador diferentes adecuados para la conjugación con un anticuerpo.

Generalmente, existen tres modos diferentes para la unión del enlazador a un dímero de la presente invención, como se ilustra en las figuras a continuación (con variables y sustituyentes opcionales en los anillos que no se muestran por simplicidad):



5 En compuestos dímero-enlazador de tipo (a), un grupo funcional para la unión del enlazador se ubica en el puente X entre las dos mitades del dímero. En compuestos dímero-enlazador de tipo (b), el enlazador se une como un producto de adición a través de un doble enlace imina. En los compuestos dímero-enlazador de los tipos (c) y (c'), un grupo funcional para la unión del enlazador se ubica en un anillo "exterior" de una unidad dimérica de THIQ, AZI o PBD.

En una realización, el compuesto dímero-enlazador de tipo (a) puede representarse por la fórmula (IIIa):



10 en la que

T es un grupo autoinmolante;

t es 0 o 1;

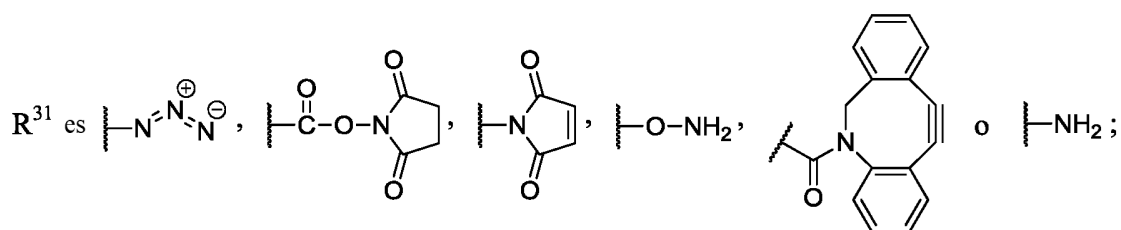
15 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, omitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

u es 0 o 1; p es 1, 2, 3 o 4;

20 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);

r es 1, 2, 3, 4 o 5;

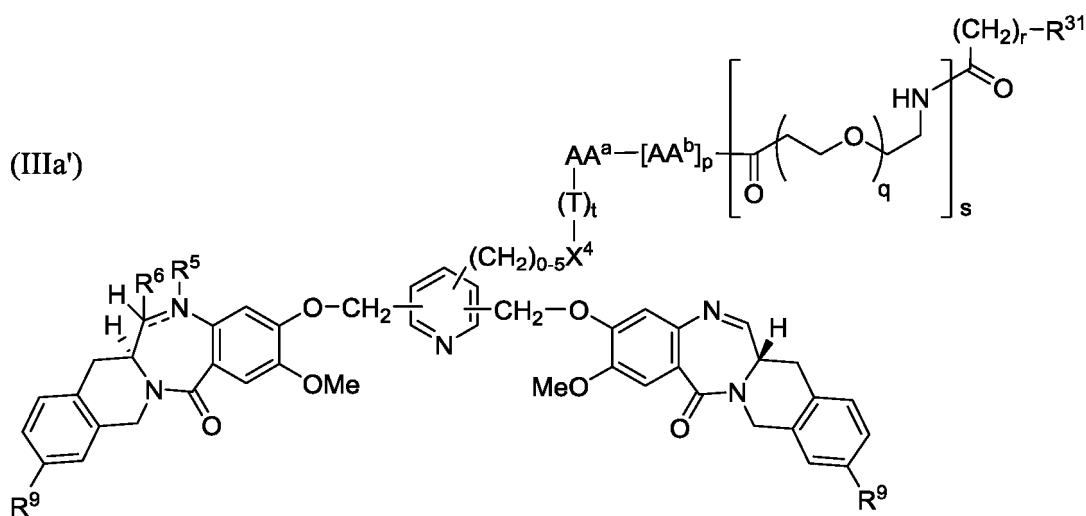
s es 0 o 1;



25 X<sup>4</sup> es S-S, O o NH; y

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, G, Y y la línea doble  $\text{---}$  son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

30 Un compuesto dímero-enlazador de tipo (a) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIa) se representa por la fórmula (IIIa')



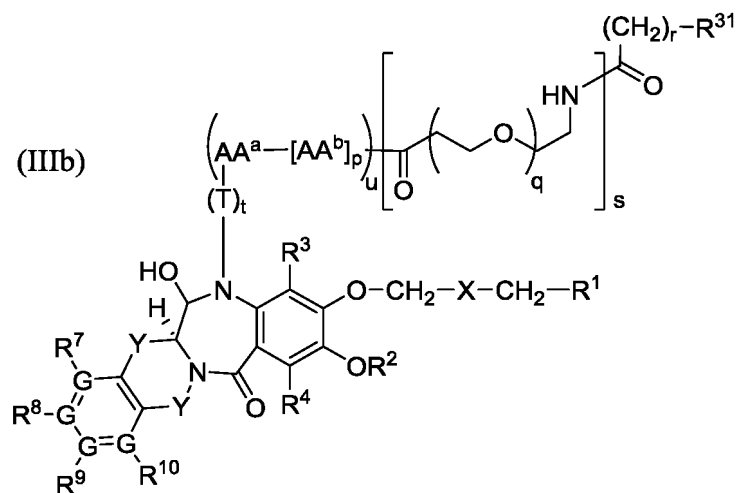
en la que

- 5  $X^4$ , T, t,  $AA^a$ ,  $AA^b$ , p, q, r, s y  $R^{31}$  son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa);  
 cada  $R^9$  es independientemente H, alquilo  $C_1$ - $C_3$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-4}H$ ,  $(CH_2CH_2O)_{1-4}$ (alquilo  $C_1$ - $C_3$ ), OH, Cl, F o Br;  
 $R^5$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es  
 un doble enlace; y  
 10  $R^6$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es  
 un doble enlace.

Preferentemente, en las fórmulas (IIIa) y (IIIa'),  $R^9$  es H y  $X^4$  es NH.

En una realización, los compuestos dímero-enlazador de tipo (b) pueden representarse por la fórmula (IIIb):

15

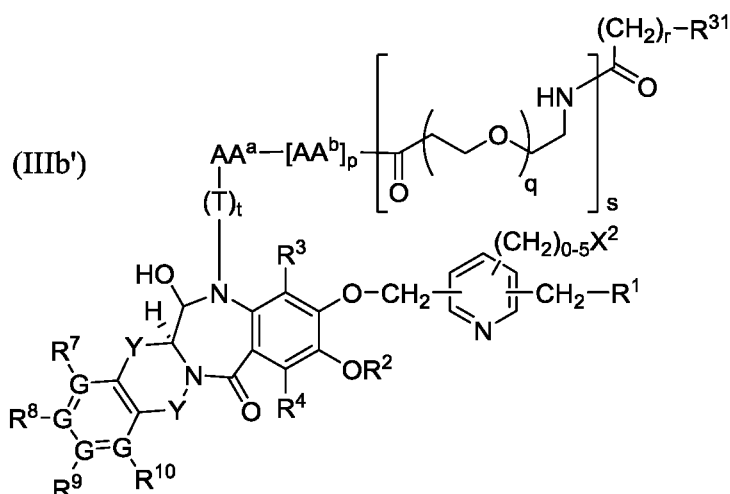


en la que

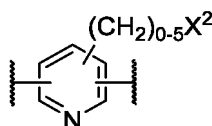
- 20 T, t,  $AA^a$ ,  $AA^b$ , u, p, q, s, r y  $R^{31}$  son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa); y  
 X,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $X^2$ , Y y G son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la  
 sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

Un dímero-enlazador de tipo (b) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIb) se representa por la fórmula (IIIb')

25

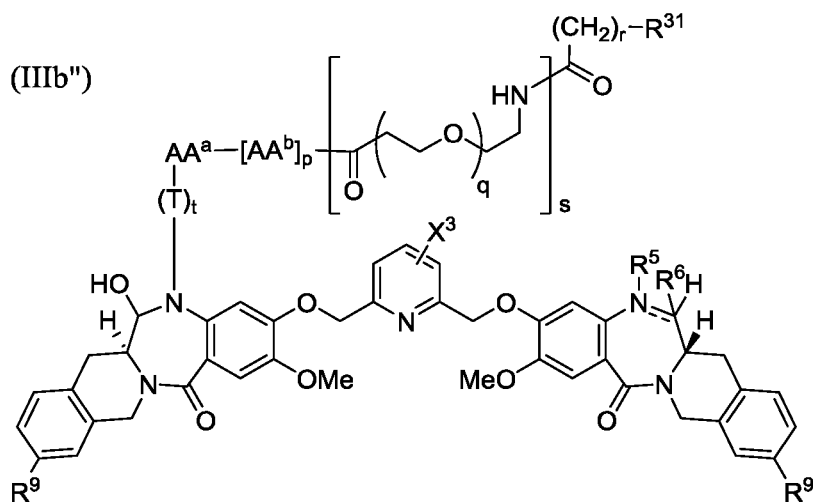


Es decir, la fórmula (I IIb') difiere de la fórmula (IIIb) en que el subíndice u es 1 y X es



5

Otro dímero-enlazador de tipo (b) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIb) se representa por la fórmula (I IIb''):



10

en la que

T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, p, q, r, s y R<sup>31</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa);  
 cada R<sup>9</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), OH, Cl, F o Br;  
 X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;

15

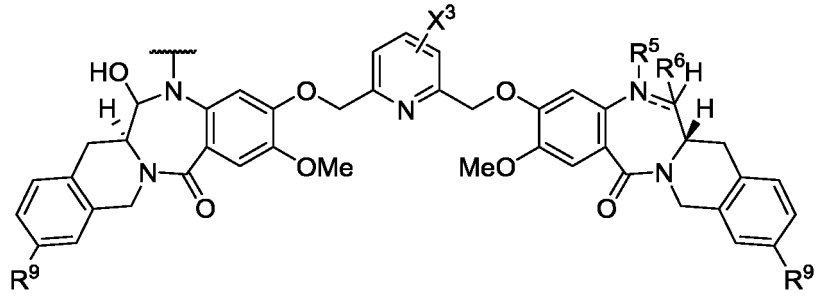
R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace.

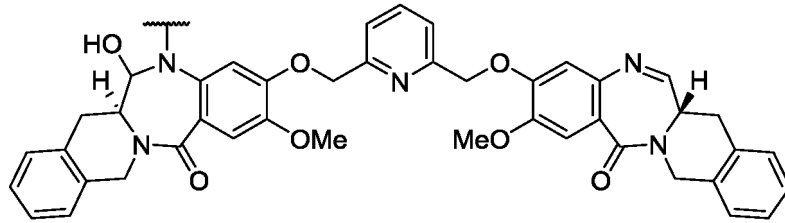
20

Preferentemente, en la fórmula (IIIb''), R<sup>9</sup> es H y X<sup>3</sup> es H

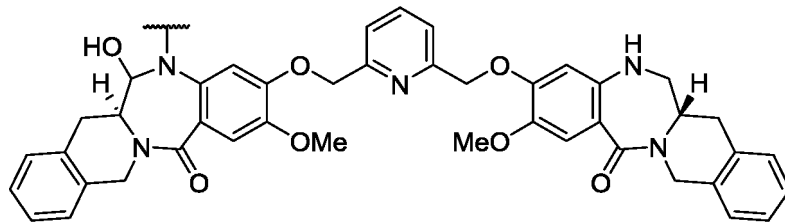
Preferentemente, en la fórmula (IIIb'') el resto



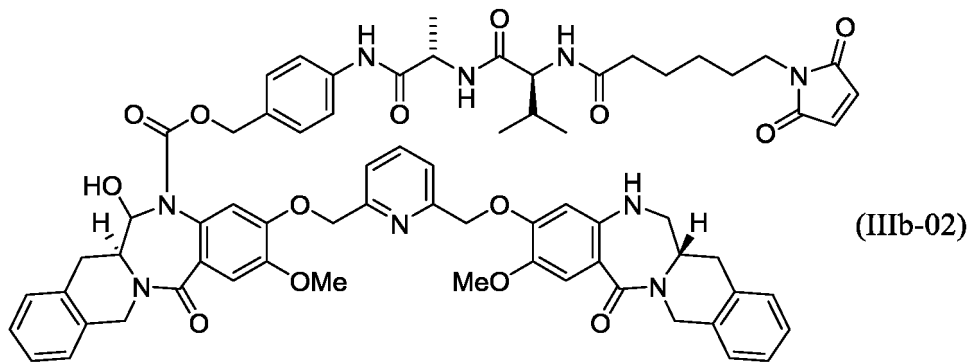
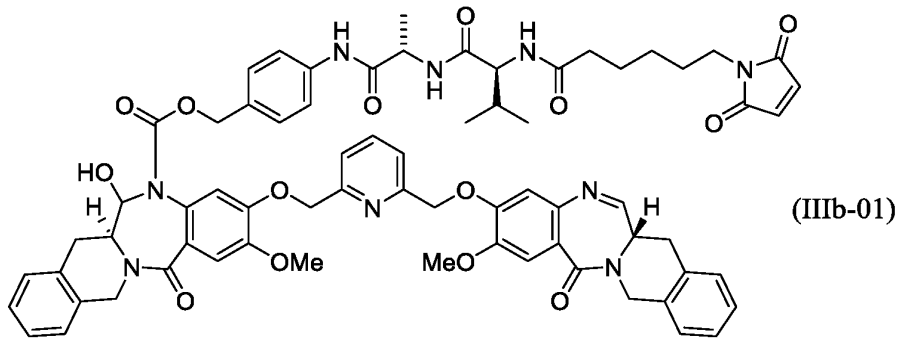
es

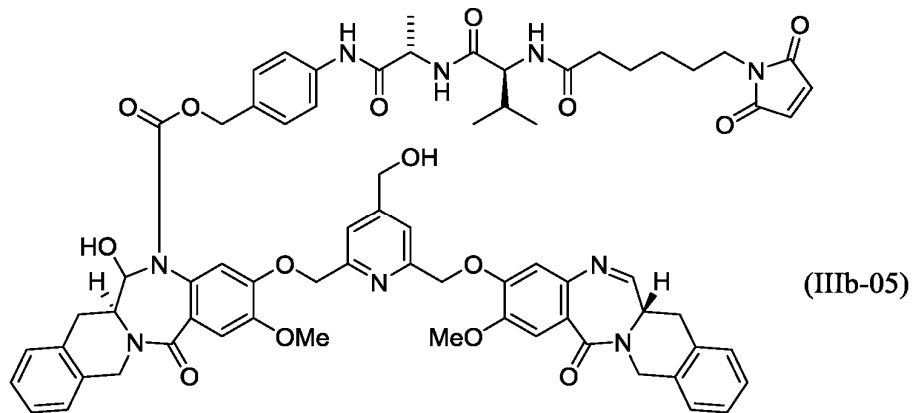
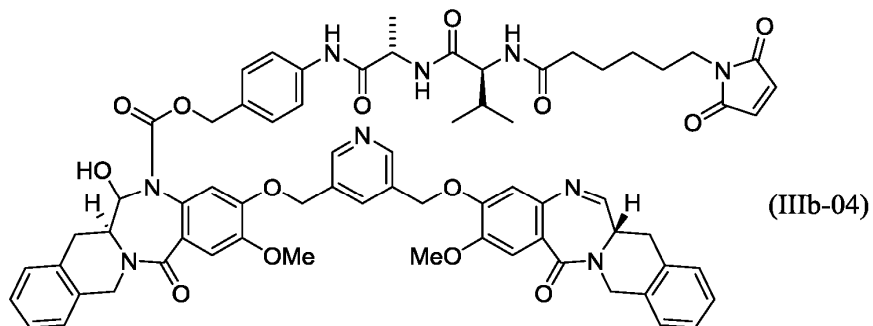
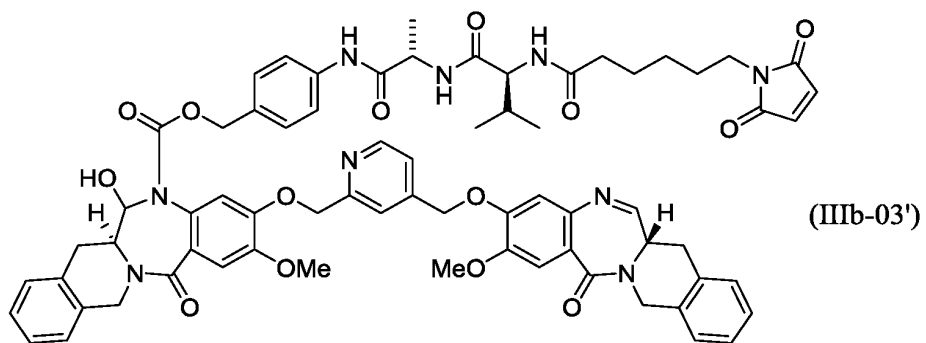
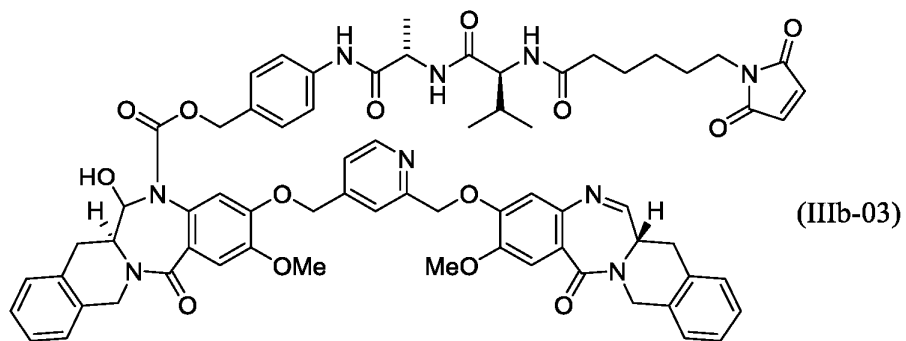


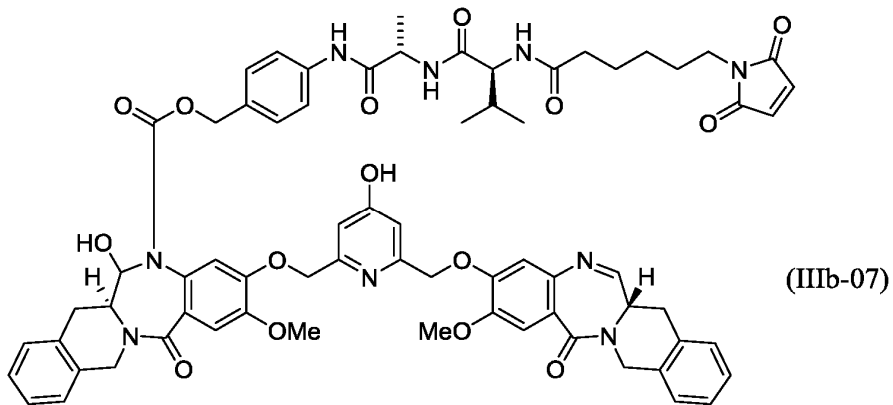
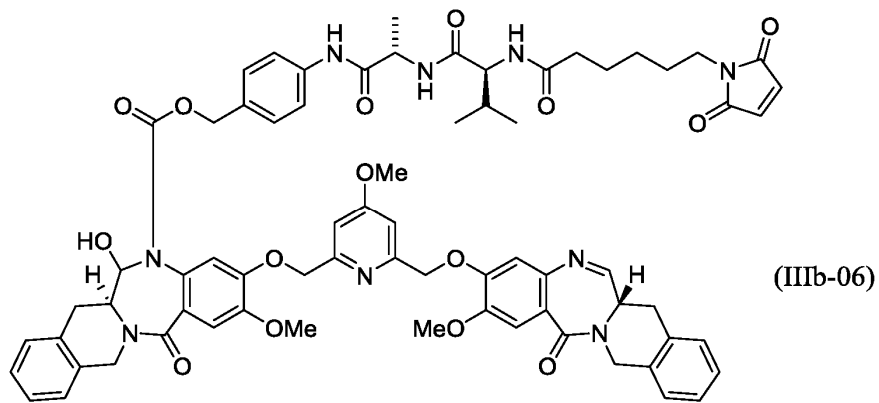
o



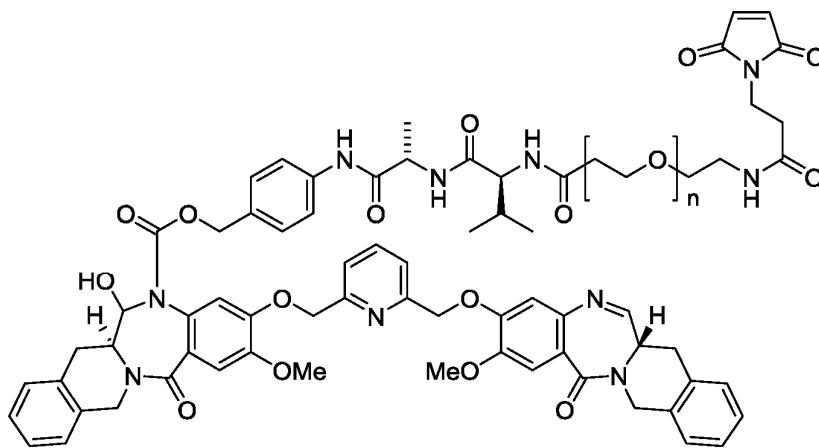
Los ejemplos de compuestos dímero-enlazador de tipo (b) incluyen:







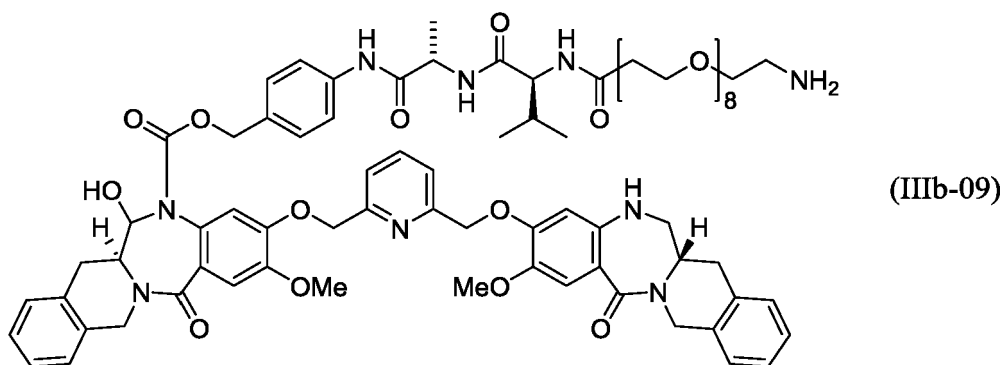
y



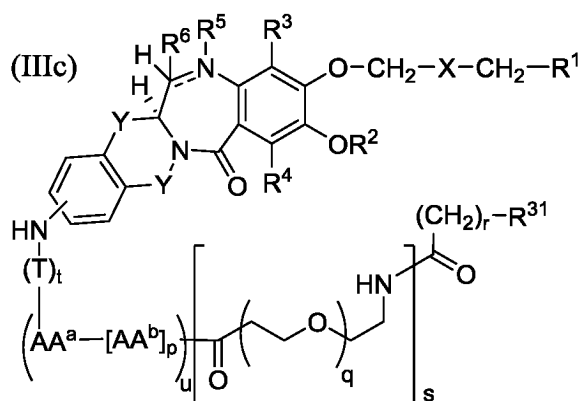
IIIb-08 n = 8    IIIb-08a n = 6  
 IIIb-08b n = 4    IIIb-08c n = 2

y





En una realización, los compuestos dímero-enlazador de tipo (c) pueden representarse por la fórmula (IIIc):



5

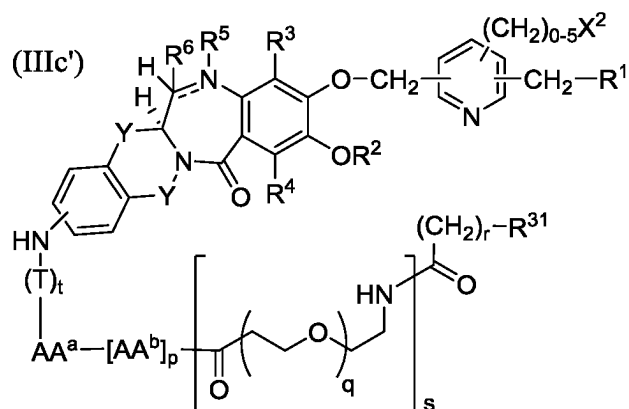
en la que

T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y R<sup>31</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa); y

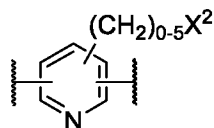
10 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, Y, X<sup>2</sup> y la línea doble  $\equiv$  son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

Un compuesto de tipo (c) dímero-enlazador preferido de acuerdo con la fórmula (IIIc) se representa por la fórmula (IIIc'):

15



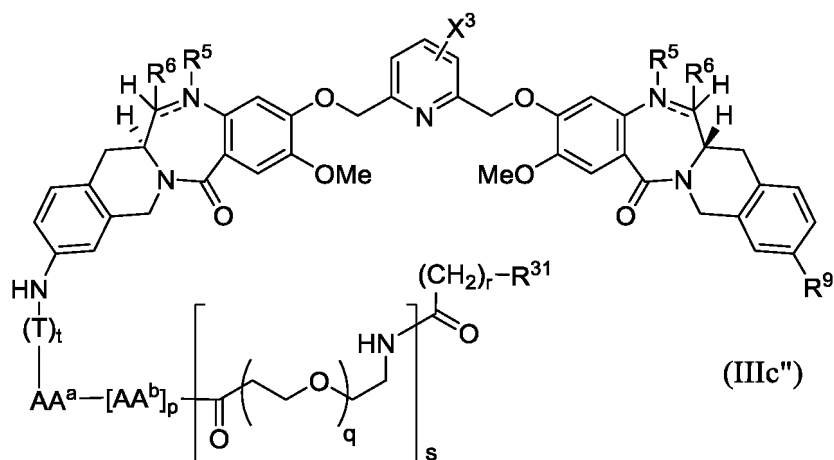
Es decir, la fórmula (IIIc') difiere de la fórmula (IIIc) en que el subíndice u es 1 y X es



20

Otro compuesto dímero-enlazador de tipo (c) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIc) se representa por la fórmula

(IIIc'')



5 en la que

$X^3$  es H, OH, OMe, Me o  $CH_2OH$ ;

al menos una de las líneas dobles  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;

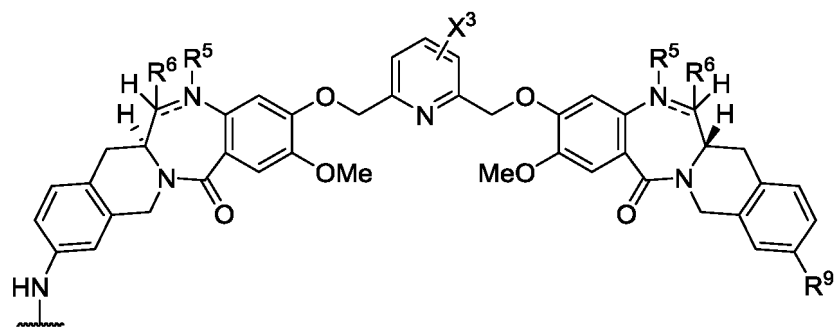
10  $R^5$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

$R^6$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

$R^9$  es H,  $O(CH_2CH_2O)_{1-4}H$ ,  $(CH_2CH_2O)_{1-4}$  (alquilo  $C_1-C_3$ ), OH, Cl, F o Br.

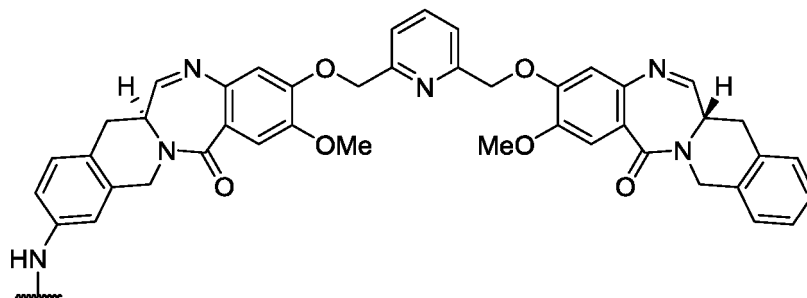
15 Preferentemente, en la fórmula (IIIc''),  $R^9$  es H y  $X^3$  es H.

Preferentemente, en la fórmula (IIIc''), el resto

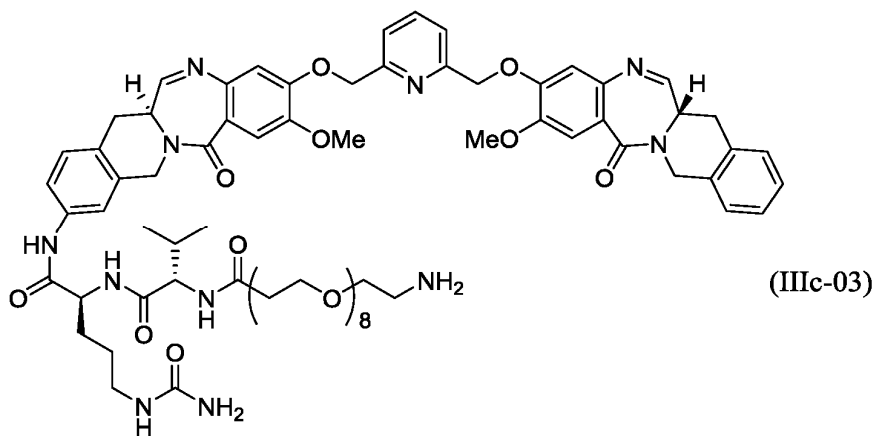
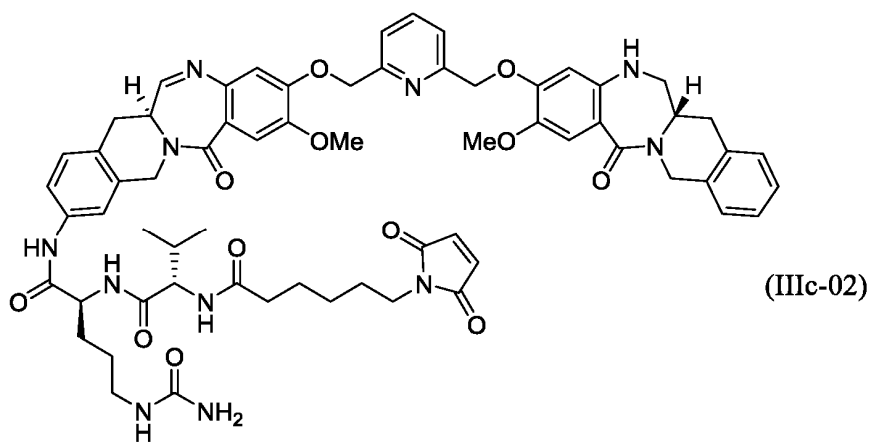
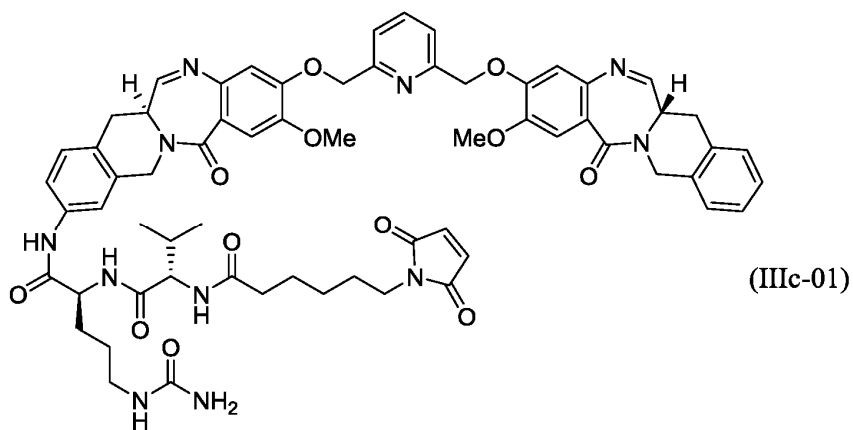


20

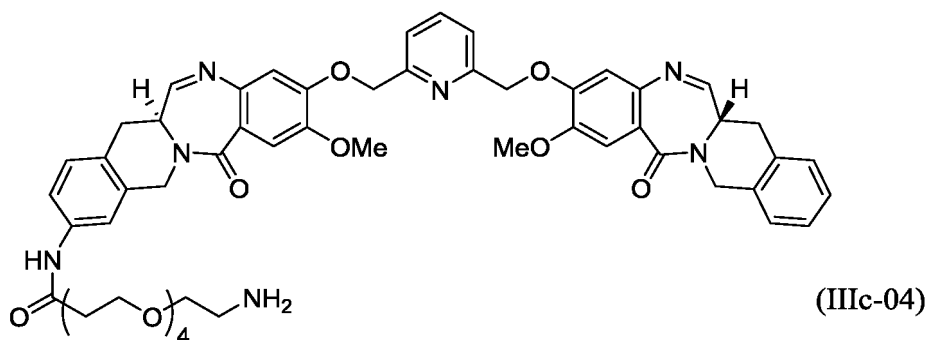
es



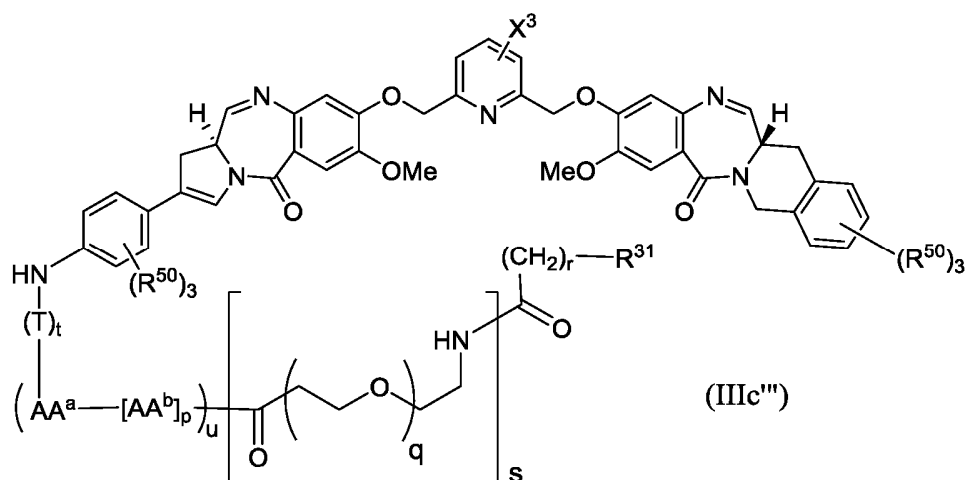
25 Los ejemplos de compuestos dímero-enlazador de tipo (c) incluyen:



y



Los dímero-enlazador de tipo (c') preferentemente son de acuerdo con la fórmula (IIIc'''):



5 en la que

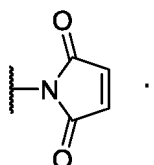
$X^3$  es H, OH, OMe, Me o  $CH_2OH$ ;

10 T, t,  $AA^a$ ,  $AA^b$ , u, p, q, s, r y  $R^{31}$  son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa); y cada  $R^{50}$  es independientemente H, O(alquilo  $C_{1-3}$ ), O(alquileno  $C_2-C_3$ ), O(alquinilo  $C_2-C_3$ ), F, Cl, Br o CN.

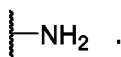
En las fórmulas (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIIc'''), donde los subíndices t y u son los dos 0, el enlazador es del tipo no escindible, como se ha analizado anteriormente en el presente documento.

15  $R^{31}$  en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIa''), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc'), (IIIc'') y (IIIc''') es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo, para efectuar la conjugación, como se ha descrito anteriormente.

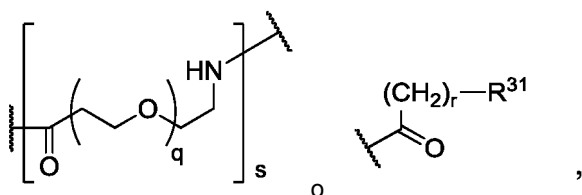
20 En una realización preferida, en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc'), (IIIc'') o (IIIc''') el grupo  $R^{31}$  es



25 En otra realización preferida, en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIa''), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc') o (IIIc''') el grupo  $R^{31}$  es



30 En las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIa''), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc'), (IIIc'') y (IIIc'''),  $-AA^a-[AA^b]_p-$  representa un polipéptido cuya longitud está determinada por el valor de p (dipéptido si p es 1, tetrapéptido si p es 3, etc.)  $AA^a$  está en el extremo carboxi del polipéptido y su grupo carboxilo forma un enlace peptídico (amida) con un nitrógeno de amina del dímero (o grupo T autoinmolante, si está presente). Por el contrario, el último  $AA^b$  está en el extremo amino del polipéptido y su grupo  $\alpha$ -amino forma un enlace peptídico con

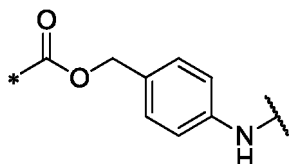


35

dependiendo de si s es 1 o 0, respectivamente. Son polipéptidos  $-AA^a-[AA^b]_p-$  preferidos Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-

Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit, escritos en la dirección de N a C convencional, como en H<sub>2</sub>N-Val-Cit-CO<sub>2</sub>H). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys o Val-Ala. Preferentemente, un polipéptido -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- es escindible por una enzima que se encuentra dentro de la célula diana (cancerosa), por ejemplo, una catepsina y, especialmente, la catepsina B.

Como indica el subíndice t igual a 0 o 1, un grupo autoinmolante T está opcionalmente presente en compuestos dímero-enlazador de fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIa''), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc') y (IIIc''). Cuando está presente, el grupo autoinmolante T es preferentemente un grupo p-aminobencil oxycarbonilo (PABC), cuya estructura se muestra a continuación, indicando un asterisco (\*) el extremo del PABC unido a un nitrógeno de amina del dímero e indicando una línea ondulada (~~~~~) el extremo unido al polipéptido -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>-.



### Preparación de conjugados

Este procedimiento general se basa en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo por reacción de grupos ε-amino de lisina con 2-iminotiolano, seguida de la reacción con un resto fármaco-enlazador que contiene maleimida, tal como se ha descrito anteriormente. Inicialmente, al anticuerpo se le intercambia el tampón en tampón de fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 2 mM y se concentra a 5-10 mg/ml. La tiolación se consigue a través de la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano que se ha de añadir puede determinarse mediante un experimento preliminar y varía de un anticuerpo a otro. En el experimento preliminar, se añade una titulación de cantidades crecientes de 2-iminotiolano al anticuerpo y después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h a TA (temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C), el anticuerpo se desala en HEPES 50 mM, Glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5 usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos tiol introducidos se determina rápidamente por reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de los grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, que puede controlarse espectroscópicamente a 324 nm. Se usan normalmente muestras a una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm puede usarse para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras y después se incuba una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 min a TA. También se incuban muestras en blanco de tampón solo más DTDP. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol usando un coeficiente de extinción para la tiopiridina de 19.800 M<sup>-1</sup>.

Normalmente, es deseable un nivel de tiolación de aproximadamente dos a tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos esto puede conseguirse mediante la adición de un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguida de la incubación a TA durante 1 h. Después, el anticuerpo se incuba con 2-iminotiolano a la relación molar deseada y después se desala en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5). El material tiolado se mantiene en hielo mientras que el número de tioles introducidos se cuantifica como se ha descrito anteriormente.

Después de la verificación del número de tioles introducidos, el resto fármaco (dímero)-enlazador se añade a un exceso molar de 2,5 veces por tiol. Se permite que la reacción de conjugación transcurra en un tampón de conjugación que contiene una concentración final de propilenglicol al 25 % y trehalosa al 5 %. Comúnmente, la solución madre de fármaco-enlazador se disuelve en DMSO al 100 %. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incuba a TA durante 2 h con agitación suave. Después se añade un exceso molar de 10 veces de N-etil maleimida (Solución madre 100 mM en DMSO) a la mezcla de conjugación y se agitan durante una hora adicional para bloquear cualquier tiol sin reaccionar.

Después, la muestra se filtra a través de un filtro de 0,2 μ. Al material se le intercambia el tampón a través de la membrana TFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO PES en glicina 10 mg/ml, sorbitol 20 mg/ml, acetonitrilo al 15 % pH 5,0 (volumen de intercambio de tampón 5X TFF) para retirar cualquier fármaco sin reaccionar. La formulación final se realiza por TFF en sorbitol 20 mg/ml, glicina 10 mg/ml, pH 5,0.

El siguiente procedimiento puede usarse para la conjugación mediada por transglutaminasa de compuestos dímero-enlazador en los que el enlazador tiene un grupo amina que puede actuar como donador de amina. El anticuerpo puede ser uno que tenga una glutamina reactiva con transglutaminasa, por ejemplo, uno con una sustitución N297A o N297Q. La conjugación se realiza mediante transglutaminasa bacteriana recombinante con una relación molar de anticuerpo:enzima de 5:1. La conjugación se realiza usando protocolos convencionales en tampón Tris 50 mM, pH 8,0, incubado durante la noche a 37 °C. El conjugado resultante se purifica en una columna de proteína A,

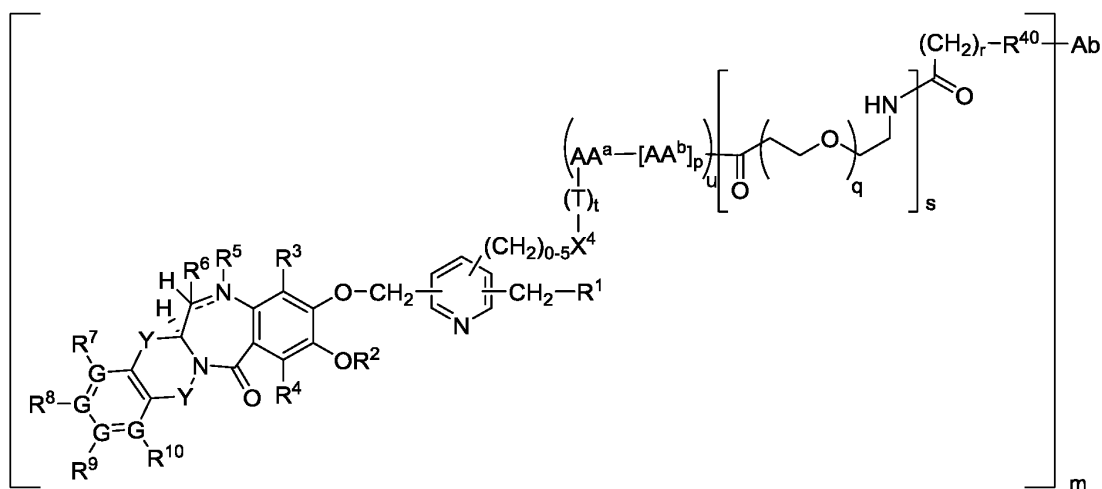
equilibrada previamente con Tris 50 mM, pH 8,0. El conjugado se eluye con tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones eluidas se neutralizan con Tris 1 M pH 9,0. El conjugado puede formularse en sorbitol 20 mg/ml, glicina 10 mg/ml, pH 5,0.

5 Los expertos en la materia comprenderán que las condiciones y metodologías descritas anteriormente son de ejemplo y no limitantes y que se conocen en la técnica otros enfoques para la conjugación que pueden usarse en la presente invención.

Conjugados

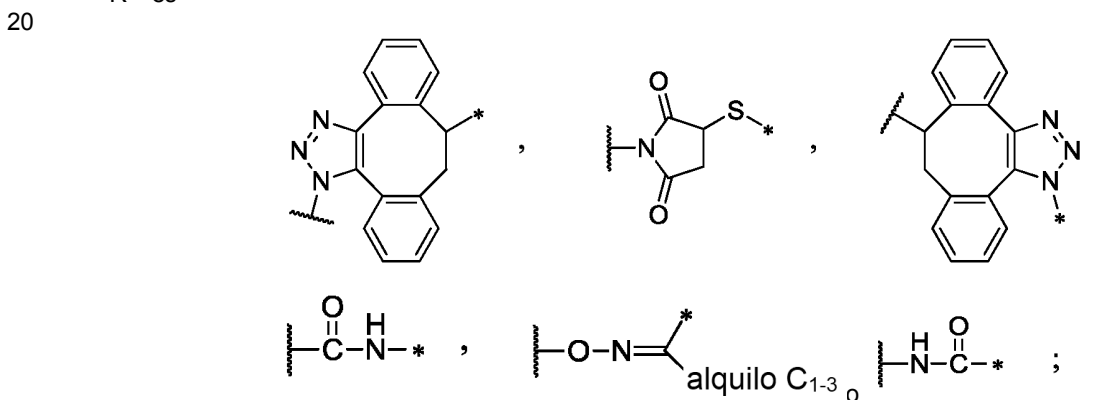
10 En una realización, los conjugados de la presente invención derivan de compuestos dímero-enlazador de tipo (a) y pueden representarse por la fórmula (IVa):

(IVa)



15 en la que

Ab es un anticuerpo;  
R<sup>40</sup> es



25 donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida a Ab se indica con un asterisco (\*) y la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida a (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> se indica con una línea ondulada (~~~~~);

m es 1,2, 3 o 4;

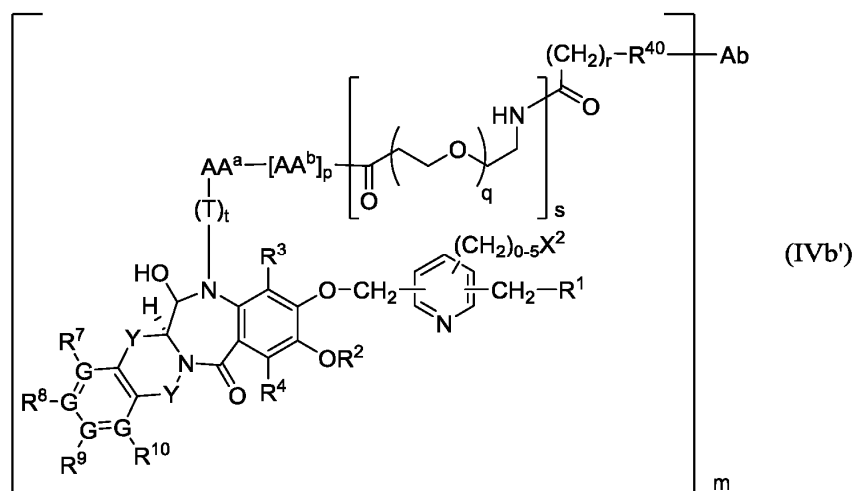
T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y X<sup>4</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa); y

30 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Y, G y la línea doble  $\overline{\text{---}}$  son como se han definido con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVa) se representa por la fórmula (IVa'):



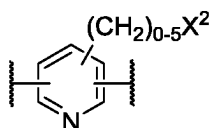
Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVb) se representa por la fórmula (IVb'):



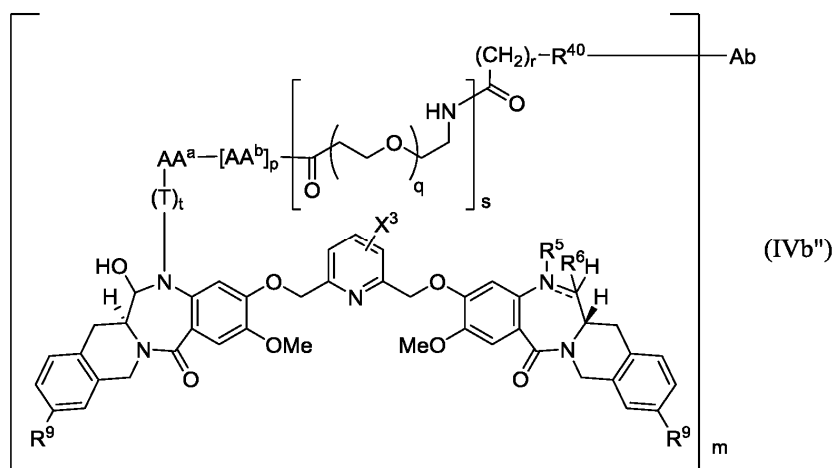
5 en la que

T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, m, p, q, s, r, R<sup>40</sup> y Ab son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa) y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Y, G y X son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa).

10 Es decir, el conjugado (IVb') difiere del conjugado (IVb) en que el subíndice u es 1 y X es



15 Otro conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVb) tiene una estructura representada por la fórmula (IVb''):



en la que

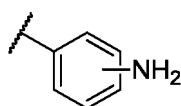
20 T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, m, p, q, s, r, R<sup>40</sup> y Ab son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa); X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;

R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

25 R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, F, Br, Cl o

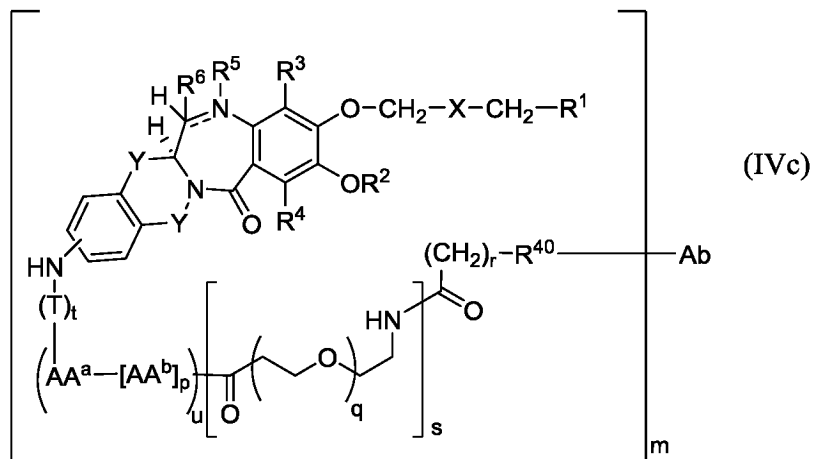




(especialmente el *para*-isómero).

5 Preferentemente, en la fórmula (IVb'), R<sup>9</sup> es H y X<sup>3</sup> es H.

En otra realización, los conjugados de la presente invención derivan de compuestos dímero-enlazador de tipo (c) y pueden representarse por la fórmula (IVc):



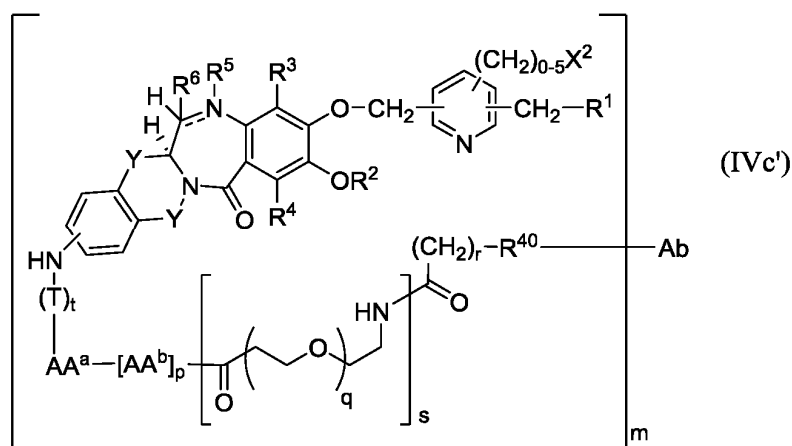
10

en la que

Ab, R<sup>40</sup>, m, T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s y r son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa); y

15 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, Y, X y la línea doble  $\equiv$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVc) se representa por la fórmula (IVc'):



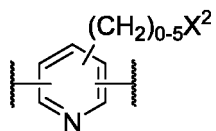
20

en la que

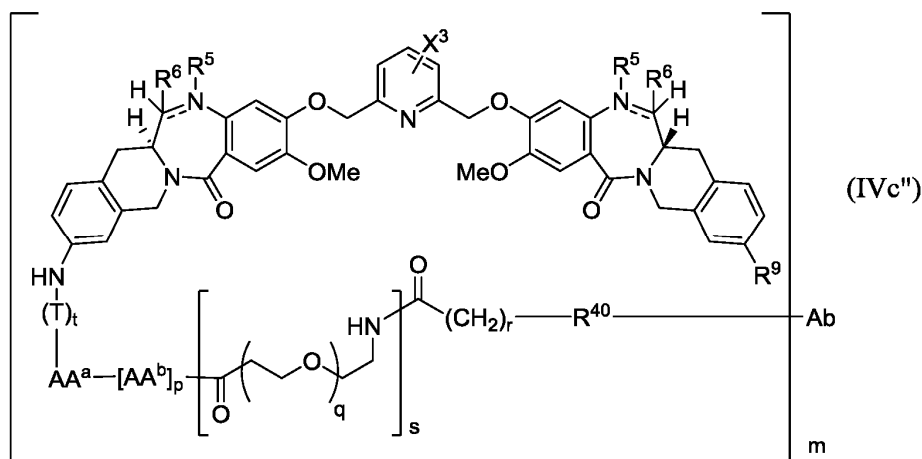
Ab, R<sup>40</sup>, m, T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, p, q, s y r son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa); y

25 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, Y, X<sup>2</sup> y la línea doble  $\equiv$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la Fórmula (I).

Es decir, el conjugado (IVc') difiere del conjugado (IVc) en que el subíndice u es 1 y X es



Otro conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVc) tiene una estructura representada por la fórmula (IVc''):



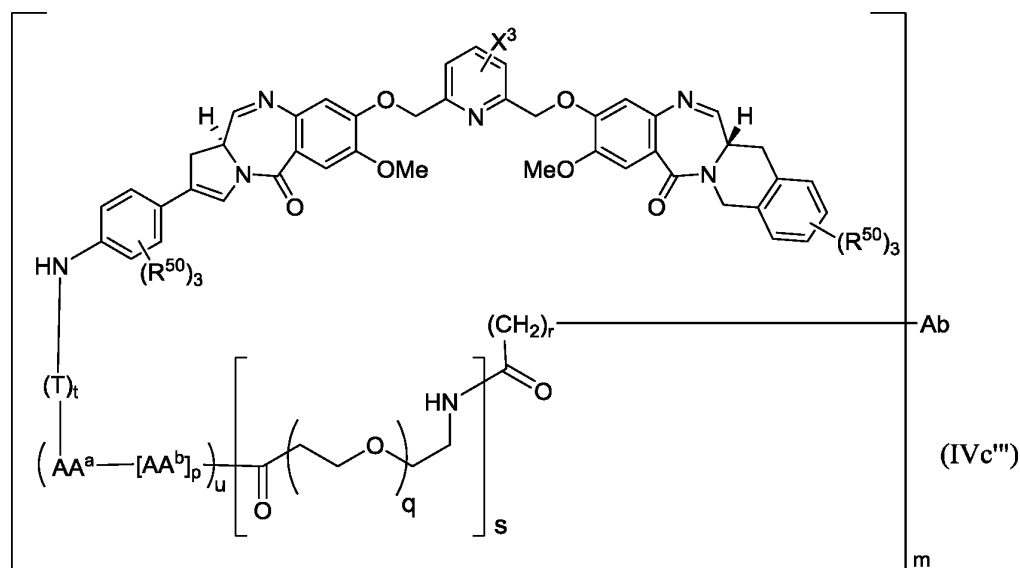
5

en la que

- 10 Ab, R<sup>40</sup>, m, T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, p, q, s y r son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa);  
X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;  
al menos una de las líneas dobles  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepam es un doble enlace;  
R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;  
15 R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y  
R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, F, Cl o Br.

Preferentemente, en la fórmula (IVc''), R<sup>9</sup> es H y X<sup>3</sup> es H.

- 20 (IVc'''): Los conjugados preferidos basados en dímero-enlazadores de tipo (c') son de acuerdo con la fórmula



en la que

Ab, R<sup>40</sup>, m, T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, p, q, s, u y r son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa);  
 X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH; y  
 cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN.

5 Las preferencias indicadas anteriormente en el presente documento con respecto a los dímero-enlazadores de fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIb''), (IIIc), (IIIc'), (IIIc'') y (IIIc''') para el polipéptido - AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- y el grupo T autoinmolante también son aplicables a conjugados de fórmulas (IVa), (IVa'), (IVb), (IVb'), (IVc), (IVc') y (IVc''').

10 En las fórmulas (IVa), (IVb), (IVc) y (IVc'''), si los subíndices t y u son los dos 0, entonces el enlazador es del tipo no escindible y se basa en la degradación del anticuerpo Ab para liberar el fármaco. El componente de polietilenglicol opcionalmente puede estar presente (es decir, s es 1) si su presencia es beneficiosa, por ejemplo, mediante el aumento de la solubilidad del compuesto fármaco-enlazador durante la conjugación y no interfiere con la actividad biológica del fármaco.

### 15 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o de un conjugado del mismo, formulado junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Puede contener opcionalmente uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales, tales como un anticuerpo u otro fármaco. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una terapia de combinación con otro agente terapéutico, especialmente otro agente antineoplásico.

20 La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes. Los excipientes que pueden usarse incluyen vehículos, agentes tensioactivos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de los mismos. La selección y uso de excipientes adecuados se enseña en Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>a</sup> Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

30 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse con un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivarlo. La frase "administración parenteral" se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, por lo general por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. También pueden formularse en una microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para lograr una alta concentración de fármaco. Las composiciones también pueden proporcionarse en forma de liofilizados, para su reconstitución en agua antes de la administración.

50 La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración y generalmente será esa cantidad de la composición la que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. "Forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se han de tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

65 La dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más por lo general de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-

10 mg/kg o, como alternativa, de 0,1 a 5 mg/kg. Las pautas de tratamiento de ejemplo son la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Las pautas de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal a través de administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una sola vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración plasmática de anticuerpos de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención preferentemente da como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos portadores de tumores, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 % y aún más preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a sujetos sin tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño tumoral o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto, que normalmente es un ser humano pero puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación controlada o sostenida, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de entrega microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse a través de dispositivos médicos tales como (1) dispositivos de inyección hipodérmica sin aguja (por ejemplo, documento US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; y 4.596.556); (2) bombas de microinfusión (documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (documento US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (documento US 4.439.196 y 4.475.196).

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la barrera hematoencefálica, pueden formularse en liposomas, que pueden comprender adicionalmente restos de direccionamiento para potenciar el transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, por ejemplo, los documentos US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016; y 5.399.331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen y Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; y Killion y Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

## USOS

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden usarse para tratar enfermedades tales como, pero sin limitación, enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de cabeza y cuello que incluyen tumores de cabeza, cuello, la cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas; cánceres de hígado y árbol biliar, en particular carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, en particular cáncer colorrectal; cáncer de ovario; cáncer de pulmón microcítico y no microcítico (CPM y CPNM); sarcomas de cáncer de mama, tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma embrionario, leiomiomasarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma alveolar de partes blandas; leucemias tales como leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mielógena crónica (LMC); neoplasias del sistema nervioso central, en particular cáncer cerebral; mieloma múltiple (MM), linfomas tales como linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma de células grandes anaplásico de linfocitos T. Clínicamente, la puesta en práctica de los métodos y el uso de las composiciones que se describen en el presente documento dará como resultado una reducción en el tamaño o número del crecimiento canceroso y/o una reducción en los síntomas asociados (cuando corresponda). Patológicamente, la puesta en práctica del método y el uso de las composiciones que se describen en el presente documento producirán una respuesta relevante patológicamente, tal como: inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción del tamaño del cáncer o tumor, prevención de metástasis adicionales e inhibición de la angiogénesis tumoral. El método de tratamiento de dichas enfermedades comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación inventiva a un sujeto. El método puede repetirse según sea necesario. Especialmente, el cáncer puede ser renal, pulmonar, gástrico u ovárico.

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden administrarse en combinación con otros agentes

terapéuticos, incluyendo anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de la angiogénesis, antimetabolitos, escindidores de ADN, entrecruzadores de ADN, intercaladores de ADN, aglutinantes del surco menor del ADN, enedinas, inhibidores de la proteína de choque térmico 90, inhibidores de la histona deacetilasa, inmunomoduladores, estabilizadores de microtúbulos, análogos de nucleósidos (purina o pirimidina), inhibidores de exportación nuclear, inhibidores del proteasoma, inhibidores de topoisomerasas (I o II), inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa. Los agentes terapéuticos específicos incluyen adalimumab, ansamitocina P3, auristatina, bendamustina, bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfán, calistatina A, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, cisplatino, cladribina, citarabina, criptoficinas, dacarbazina, dasatinib, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, epotilonas, etopósido, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, ipilimumab, hidroxiurea, imatinib, infliximab, interferones, interleucinas, h-lapachona, lenalidomida, irinotecán, maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptapurina, metotrexato, mitomicina C, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), 6-tioguanidina, tiotepa, tenipósido, topotecán, trastuzumab, tricostatina A, vinblastina, vincristina y vindesina.

### Ejemplos

La puesta en práctica de la presente invención puede comprenderse adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación. Los siguientes procedimientos generales son ilustrativos, y los expertos en la materia comprenden que pueden usarse métodos alternativos pero equivalentes.

Algunos espectros de RMN-<sup>1</sup>H se ejecutaron en instrumentos Bruker 600, 500 o 400 MHz y los desplazamientos químicos se publicaron en ppm ( $\delta$ ) con respecto al tetrametilsilano ( $\delta = 0,0$ ). Generalmente, las evaporaciones se realizaron a presión reducida.

Estos dos métodos de análisis por CL/EM son ilustrativos:

Columna A: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7  $\mu$ m; Fase móvil A: agua con TFA al 0,05 % (ácido trifluoroacético); Fase móvil B: acetonitrilo con TFA al 0,05 %; [2-98 % en 1,5 min, con un tiempo de ejecución de 3 min]; Temperatura: 40 °C; Flujo: 0,8 ml/min y un detector de UV ajustado a 220 o 254 nm.

Columna B: PhenomenexLuna, 2,0 x 30 mm, partículas de 3  $\mu$ m; Fase móvil A: 10 % de acetonitrilo/90 % de agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90 % de acetonitrilo/10 % de agua con TFA al 0,1 %; [0-100 % en 2 min, con un tiempo de ejecución de 4 min]; Temperatura: 40 °C; Flujo: 1,0 ml/min y un detector de UV ajustado a 220 o 254 nm.

### Ejemplo 1 - Compuesto intermedio 6

Este ejemplo y la **Fig. 1** se refieren a la síntesis del compuesto intermedio **6**, que se usa para la preparación de dímeros de la presente invención.

Se preparó cloruro de 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoilo **1** a partir del éster metílico correspondiente de la siguiente manera: A una solución de 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoato de metilo (Harve Chem, 15 g, 47,3 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 350 ml) se le añadió una solución de NaOH ac. (56,7 ml, 142 mmol, 2,5 M). La reacción se agitó a 50 °C durante 5 h. La reacción se enfrió a TA (TA) y después se concentró al vacío para retirar el THF. La capa acuosa restante se acidificó con HCl ac.(6 N) a pH 2. El precipitado de color amarillo resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para proporcionar ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico (14,32 g, rendimiento del 100 %). CLEM (M+H) = 304,08. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, METANOL-d<sub>4</sub>)  $\delta$  7,60 (s, 1H), 7,53 - 7,45 (m, 2H), 7,45 - 7,31 (m, 3H), 7,29 (s, 1H), 5,23 (s, 2H), 3,98 (s, 3H).

A una solución del ácido nitrobenzoico anterior (3,5 g, 11,54 mmol) en THF (150 ml) se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (1,212 ml, 13,85 mmol), seguido de N,N-dimetilformamida (DMF, 50  $\mu$ l). La solución resultante se agitó a TA durante 2 h antes de concentrarse al vacío para proporcionar cloruro de ácido **1** en forma de un sólido de color amarillo.

El cloruro ácido **1** se disolvió en THF (35 ml) y se añadió gota a gota a una solución de sal de ácido p-toluenosulfónico de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de (S)-bencilo **2** (Accela, 5,58 g, 12,70 mmol) y trietilamina (4,83 ml, 34,6 mmol) en THF (80 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h antes de que se inactivase con agua y se concentró para retirar el THF. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. y después salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/diclorometano (DCM) en 15 minutos) para proporcionar el éster **3** (6,25 g, rendimiento del 98 %). CLEM (M+H) = 553. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,95 - 7,72 (m, 1H), 7,57 - 7,35 (m, 5H), 7,34 - 7,0 (m, 8H), 7,14 - 6,98 (m, 1H), 6,94 - 6,69 (m, 1H), 5,39 - 5,19 (m, 2H), 5,19 - 5,08 (m, 1H), 4,99 (c, J = 12,4 Hz, 1H), 4,75 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,65 - 4,40 (m, 2H), 4,28 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 3,86 (s. a., 3H), 3,71 (s, 1H), 3,50 - 3,18 (m, 1H).

Una suspensión de éster **3** (6,25 g, 11,31 mmol), cinc (4,44 g, 67,9 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (7,26 g, 136 mmol) en MeOH (50 ml) se calentó a 50 °C durante 16 h. La reacción se enfrió a TA y se diluyó con MeOH. La mezcla resultante se filtró a través de un lecho de CELITE™, lavando sucesivamente con EtOAc, DCM y MeOH. Los filtrados se combinaron y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 120 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/DCM en 15 minutos) para proporcionar diona **4** (4,5 g, rendimiento del 96 %). CLEM (M+H) = 415. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,49 - 7,40 (m, 4H), 7,32 (s. a., 6H), 6,45 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,13 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,21 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,52 (dd, J = 15,4, 7,0 Hz, 1H), 3,02 (dd, J = 15,4, 6,4 Hz, 1H).

Una solución de diona **4** (4,5 g, 10,86 mmol) en DMF (54,3 ml) se enfrió a 0 °C antes de que se añadiera NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,54 g, 13,57 mmol) por lotes. La mezcla resultante se agitó durante 30 min antes de que se añadiera (2-(clorometoxi)etil)trimetilsilano (SEM-Cl, 2,31 ml, 13,03 mmol). La reacción se calentó a TA y se agitó durante 1 h antes de que se interrumpiese con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 50 % de EtOAc/DCM en 15 min) para proporcionar SEM-diona **5** (4,60 g, rendimiento del 78 %). CLEM (M+H) = 545. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,59 - 7,41 (m, 2H), 7,40 - 7,21 (m, 9H), 5,43 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,14 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,50 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,41 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,33 - 4,16 (m, 1H), 4,13 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,82 - 3,46 (m, 3H), 3,06 - 2,84 (m, 1H), 1,26 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 0,97 (ddd, J = 9,9, 6,8, 2,6 Hz, 2H), 0,10 - 0,01 (m, 9H).

Una suspensión de SEM-diona **5** (4,68 g, 8,59 mmol) y Pd/C (10 %, 0,457 g) en EtOH (10 ml) se agitó con un globo de H<sub>2</sub> a TA durante 3 h. La reacción se filtró a través de un lecho CELITE™, se lavó con EtOH y se concentró al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 120 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/DCM en 15 min) para proporcionar compuesto **6** (3,23 g, rendimiento del 83 %). CLEM (M+H) = 455. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,40 - 7,21 (m, 5H), 5,97 (s, 1H), 5,46 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 5,18 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,72 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,58 - 4,24 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,83 - 3,44 (m, 3H), 3,14 - 2,88 (m, 1H), 0,99 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 0,14 (s, 9H).

### Ejemplo 2 - Compuesto intermedio 13

Este ejemplo y la **Fig. 2** se refieren a la síntesis de compuestos intermedios adicionales útiles en la preparación de dímeros de la presente invención.

Se disolvió cloruro ácido **1** en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a una solución de carboxilato **7** (Borzilleri et al., documento WO 2014/047024 A1 (2014), 1,6 g, 6,39 mmol) y NEt<sub>3</sub> (2,67 ml, 19,2 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. La solución de reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante 30 min. La reacción se interrumpió con agua y se concentró para retirar el THF. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub>, después salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/Hexano en 15 min) para proporcionar el éster etílico **8** (2,66 g, rendimiento del 78 %). CLEM (M+H) = 536,4.

Una suspensión del éster etílico **8** (1,75 g, 3,55 mmol), cinc (1,394 g, 21,32 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (2,281 g, 42,6 mmol) en MeOH (10 ml) se calentó a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™, lavando con una cantidad copiosa de MeOH al 20 % en DCM. El filtrado se concentró para proporcionar amino-diona **9** en forma de un sólido de color blanco (1,25 g, 2,90 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM (M+H) = 430,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,26 (s. a., 1H), 7,53 - 7,31 (m, 6H), 7,24 (s, 1H), 6,92 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,50 - 6,41 (m, 2H), 5,07 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 5,00 - 4,88 (m, 2H), 4,84 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,09 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,01 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,12 (dd, J = 15,3, 7,6 Hz, 1H), 2,78 (dd, J = 15,2, 6,2 Hz, 1H).

A una solución de amino-diona **9** (1,6 g, 3,73 mmol) y cloruro de tritilo (1,246 g, 4,47 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió NEt<sub>3</sub> (0,779 ml, 5,59 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h y se concentró. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, 0-50 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar tritil-diona **10** en forma de un sólido de color blanco (2,2 g, 3,27 mmol, rendimiento del 88 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,01 (s, 1H), 7,50 - 7,12 (m, 22H), 6,77 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,47 - 6,34 (m, 2H), 6,16 (dd, J = 8,1, 2,4 Hz, 1H), 5,02 (s. a., 1H), 4,91 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,18 - 4,09 (m, 2H), 4,05 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,28 (dd, J = 15,4, 7,7 Hz, 1H), 2,75 (dd, J = 15,4, 6,4 Hz, 1H).

A una solución de tritil-diona **10** (2,2 g, 3,27 mmol) en DMF (15 ml) a 0 °C se le añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,236 g, 3,93 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min antes de que se añadiera SEM-Cl (0,697 ml, 3,93 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h antes de que se inactivase con salmuera. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 40 g, 0-50 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar SEM-diona **11** (2,1 g, 2,62 mmol, rendimiento del

80 %). CLEM (M-trilito) = 560,4. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,48 - 7,42 (m, 2H), 7,41 - 7,32 (m, 9H), 7,31 - 7,18 (m, 11H), 6,77 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,19 (dd, J = 8,3, 2,3 Hz, 1H), 5,45 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,08 - 4,92 (m, 2H), 4,49 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,13 - 4,08 (m, 1H), 4,02 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,71 (td, J = 9,6, 7,0 Hz, 1H), 3,61 (td, J = 9,6, 7,2 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 15,5, 8,3 Hz, 1H), 2,72 (dd, J = 15,5, 6,5 Hz, 1H), 1,05 - 0,92 (m, 2H), 0,06 (s, 9H).

Una suspensión de SEM-diona **11** (950 mg, 1,18 mmol) y Pd/C (10 %, 200 mg) en EtOAc (20 ml) se agitó con un globo de H<sub>2</sub> durante 2 días. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™ y se lavó con EtOAc y después con MeOH. Los filtrados combinados se concentraron y se purificaron usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 40 g, 0-100 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar compuesto **12** (510 mg, 1,08 mmol, rendimiento del 90 %). CLEM (M+H) = 470,2. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,33 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,09 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,67 - 6,54 (m, 2H), 6,02 (s, 1H), 5,47 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,29 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,22 (dd, J = 7,7, 6,5 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,79 - 3,60 (m, 4H), 3,47 (dd, J = 15,4, 7,7 Hz, 1H), 2,90 (dd, J = 15,5, 6,4 Hz, 1H), 1,09 - 0,94 (m, 2H), 0,05 (s, 9H).

A una solución del compuesto **12** (500 mg, 1,065 mmol) en THF (3 ml) a 0 °C se le añadió NEt<sub>3</sub> (0,742 ml, 5,32 mmol). Se añadió clorofornato de alilo **12a** (513 mg, 4,26 mmol) gota a gota. La solución resultante se agitó a 0 °C durante 2 h y se diluyó con MeOH (5 ml) y LiOH ac. (2 ml, 2 N). La mezcla resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 24 g, 0-10 % de MeOH/DCM) para proporcionar compuesto **13** en forma de un sólido de color blanco (440 mg, 0,795 mmol, rendimiento del 74,6 %). CLEM (M+H) = 554,2. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,38 - 7,30 (m, 3H), 7,27 - 7,21 (m, 2H), 6,96 (s, 1H), 6,28 (s, 1H), 6,02 - 5,89 (m, 1H), 5,44 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,35 (dc, J = 17,2, 1,5 Hz, 1H), 5,26 (dc, J = 10,4, 1,3 Hz, 1H), 5,10 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 4,40 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,31 - 4,23 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,79 - 3,58 (m, 2H), 3,51 (dd, J = 15,6, 7,3 Hz, 1H), 2,96 (dd, J = 15,5, 6,4 Hz, 1H), 1,07 - 0,95 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

### Ejemplo 3 - Más intermedios

Este ejemplo y las Fig. 3 y 4 se refieren a la preparación de intermedios adicionales útiles en la síntesis de dímeros de la presente invención.

Se cargó un matraz con ácido 5-metoxi-2-nitro-4-((trisisopropilsilil)oxi)benzoico **14** (N.º de reg. de CAS 1430738-03-6, 9,0 g, 24,36 mmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU, 10,19 g, 26,8 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min y se trató con N,N-disopropiletilamina (DIEA o DIPEA, 4,68 ml, 26,8 mmol) e isoquinolina **15** (N.º de reg. de CAS 215928-81-7, 7,43 g, 26,8 mmol). La reacción se mantuvo a 0 °C durante 3 h y después se agitó a TA durante 24 h. La mezcla de reacción se vertió en NH<sub>4</sub>Cl saturado y DCM. La fase orgánica se recogió y se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se purificó adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10 % -30 % en hexanos. El producto se recogió y se concentró para proporcionar la amida **16** en forma de un aceite de color castaño claro (10,15 g, rendimiento del 66 %). CLEM M+H = 629,65.

Una solución de amida **16** (10,1 g, 16,06 mmol) se enfrió en MeOH (200 ml) a 0 °C y se añadieron NH<sub>4</sub>Cl (4,29 g, 80 mmol) y polvo de cinc (5,25 g, 80 mmol). La suspensión de color verde resultante se agitó a 0 °C durante 45 min, después se dejó calentar a TA durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™ (lavado con MeOH) y el filtrado se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se recogió en DCM y se cargó en un lecho de gel de sílice. Esto se lavó abundantemente con EtOAc al 50 % y hexanos para proporcionar anilina **17** (8,02 g, rendimiento del 83 %). CLEM M+H = 599,35.

Se disolvió anilina **17** (2500 mg, 4,17 mmol) en DCM (50 ml) y se añadió piridina (0,878 ml, 10,85 mmol). La mezcla se enfrió a -78 °C y se añadió clorofornato de alilo **12a** (0,579 ml, 5,43 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a esta temperatura durante 1 h y después se dejó calentar a TA. La mezcla de reacción se vertió en NH<sub>4</sub>Cl saturado y DCM. La mezcla se extrajo con DCM y se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10 %-50 % en hexanos para proporcionar carbamato **18** (2,5 g, rendimiento del 88 %). CLEM M+H = 683,40.

El carbamato **18** (1,372 g, 2,009 mmol) se disolvió en MeOH (20 ml). Se añadió HCl concentrado al 10 % en MeOH (2 ml, 6,58 mmol). La mezcla se envejeció durante 20 min y se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> (0,591 g, 7,03 mmol) en agua. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo 4 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La purificación por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-50 %/Hexanos proporcionó alcohol **19** (963 mg, rendimiento del 84 %). CLEM M+H = 569,25.

Se disolvió cloruro de oxalilo (2,0 M, 1,450 ml, 2,90 mmol) en DCM (30 ml) y después la mezcla se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco/acetona. A esto se le añadió DMSO (0,515 ml, 7,25 mmol, disuelto en ~2 ml de DCM para evitar la congelación durante la adición) y la temperatura se mantuvo a -78 °C. Después de 20 min, se añadió alcohol **19** (1,65 g, 2,90 mmol) disuelto en DCM (10 ml) a la reacción. Esto se dejó agitar durante 30 min adicionales y después se añadió NEt<sub>3</sub> (2,022 ml, 14,50 mmol). Después de 10 min la reacción se dejó calentar a TA. Esto se

interrumpió con NH<sub>4</sub>Cl saturado y se extrajo con DCM (2 veces). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron hasta obtener un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 30 %-100 % en hexanos. El producto se recogió y se concentró para proporcionar aminal **20** en forma de un sólido de color blanco (1,51 g, rendimiento del 92 %). CLEM M+H = 567,30.

5 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ 7,39 - 7,24 (m, 5H), 7,22 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 5,75 (dd, J = 11,2, 5,6 Hz, 1H), 5,31 (dd, J = 9,5, 4,0 Hz, 1H), 5,22 - 5,07 (m, 2H), 4,84 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 4,64 - 4,49 (m, 2H), 4,44 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,77 - 3,61 (m, 1H), 3,28 - 3,01 (m, 3H), 1,34 - 1,18 (m, 3H), 1,09 (dd, J = 7,4, 2,6 Hz, 18H).

10 Se disolvió aminal **20** (776 mg, 1,369 mmol) en DCM (12 ml) y se añadió 2,6-lutidina (0,638 ml, 5,48 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (TBSOTf, 0,943 ml, 4,11 mmol). La mezcla se envejeció durante 30 min, se diluyó con DCM, se inactivó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo 2 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-30 %/hexanos para proporcionar silil éter **21** (907,6 mg, 1,333 mmol, rendimiento del 97 %). La RMN-<sup>1</sup>H mostró

15 que el material purificado estaba contaminado con -0,25 equivalentes de 2,6-lutidina (-4 % en peso), pero se usó sin ninguna purificación adicional. CLEM M+H = 681,25.

20 Se disolvió silil éter **21** (907 mg, 1,332 mmol) en DMF (5 ml) y agua (0,1 ml). Se añadió acetato de litio (88 mg, 1,332 mmol) y la mezcla se envejeció durante la noche. La mayor parte de la DMF se evaporó con una corriente de nitrógeno. El resto se diluyó con EtOAc, se lavó 2 veces con ácido cítrico 0,1 M y después una vez con salmuera. Las fases orgánicas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El resto se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 30-70 %/hexanos para proporcionar fenol **22** (707,4 mg, 1,107 mmol, rendimiento del 83 %) que contenía algo de EtOAc por RMN-<sup>1</sup>H (aprox. 1,3 equiv.; rendimiento ajustado para tener en cuenta el EtOAc). CLEM M+H = 525,10.

25 Volviendo ahora a la **Fig. 4**, se disolvió compuesto **17** (2,1 g, 3,51 mmol) en DCM (30 ml) y se añadió piridina (0,3 ml, 3,71 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C. Se añadió carbonocloridato de 4-nitrofenilo **23** (0,707 g, 3,51 mmol) y la mezcla se envejeció durante 7 min a la misma temperatura. Se añadió una solución de compuesto **24** (N.º de reg de CAS 1343407-91-9, 1,323 g, 3,51 mmol) y DIEA (0,750 ml, 4,29 mmol) en DMF (3 ml). La mezcla se colocó

30 en un evaporador rotativo a TA para retirar el DCM. Después de 20 min, el DMF se evaporó en una corriente de nitrógeno y después el resto se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-100 % en hexanos para proporcionar compuesto **25** (1,579 g, 1,575 mmol, rendimiento del 44,9 %). CLEM M+H = 1002,50.

35 Una solución del compuesto **25** (1,579 g, 1,575 mmol) en MeOH (14,4 ml) se trató con HCl concentrado al 10 % en MeOH (1,6 ml, 5,27 mmol). La mezcla se envejeció 30 min, se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y se extrajo con cloroformo (3 veces). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron para dejar un residuo. El residuo se combinó con otro lote de la misma reacción (comenzando con 0,816 g de compuesto **25**) para la purificación. Los residuos en bruto combinados se purificaron por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 20-100 %/Hexanos para proporcionar el carbamato **26** (1,7412 g, 1,961 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM M+H = 888,30.

45 Una solución de cloruro de oxalilo (2,0 M, 1,00 ml, 2,000 mmol) en 10 ml de DCM se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota una solución de DMSO (0,348 ml, 4,90 mmol) en 5 ml de DCM y la mezcla se envejeció a la misma temperatura durante 10 min. Se añadió gota a gota una solución de carbamato **26** (1741,2 mg, 1,961 mmol) en 5 ml de DCM y la mezcla se envejeció nuevamente durante 15 min. Se añadió gota a gota NEt<sub>3</sub> (1,366 ml, 9,80 mmol); la mezcla se envejeció a la misma temperatura durante 5 min y después se retiró el baño frío y la mezcla se dejó calentar a TA. La mezcla se inactivó con solución de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50-80 %/Hexanos para proporcionar

50 compuesto **27** (1376,7 mg, 1,554 mmol, rendimiento del 79 %). CLEM M+H = 886,30.

55 El compuesto **27** (1045 mg, 1,179 mmol) se disolvió en DCM (10 ml) y se añadió 2,6-lutidina (0,549 ml, 4,72 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (0,813 ml, 3,54 mmol). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 20-100 %/Hexanos. Se obtuvieron algunas fracciones mixtas, que se volvieron a purificar por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50 %/Hexanos (isocrático). Las fracciones puras se combinaron para proporcionar compuesto **28** (676,9 mg, 0,677 mmol, rendimiento del 57,4 %). CLEM M+H = 1000,30.

60 Una solución del compuesto **28** (676 mg, 0,676 mmol) en DMF (5 ml) y agua (0,1 ml) se trató con LiOAc (44,6 mg, 0,676 mmol). La mezcla se envejeció durante la noche y el disolvente se evaporó en una corriente de nitrógeno. El resto se repartió entre EtOAc y ácido cítrico 0,1 M. Las fases se separaron y las fases orgánicas se lavaron dos veces con ácido cítrico 0,1 M, una vez con salmuera y después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50-100 %/Hexanos para proporcionar compuesto **29** (543,6 mg, 0,644 mmol, rendimiento del 95 %). CLEM M+H = 844,35.

65



**Ejemplo 4 - Enlazador con grupo PABC**

Este ejemplo y la **Fig. 5** se refieren al enlazador con un grupo autoinmolante de PABC.

5 A una solución del compuesto **30** (Firestone et al. documento US 6.124.345 B1 (2001), Ejemplo 57; 0,75 g, 1,246 mmol) en DMF (2 ml) y THF (8 ml) se le añadió dietilamina (2,81 ml, 26,9 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1,5 h y se concentró. El producto en bruto se trituró con DCM, se filtró y se secó al vacío para proporcionar compuesto **31** en forma de un sólido de color blanco. CLEM (M+H) = 380,2 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,06 (s, 1H), 8,15 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,26 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,00 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,13 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 4,56 - 4,33 (m, 3H), 3,07 - 2,93 (m, 3H), 2,00 - 1,55 (m, 5H), 1,49 - 1,32 (m, 2H), 0,90 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,80 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

15 A una solución del compuesto **31** (79 mg, 0,209 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadió una solución de éster de MAL-dPEG@8-NHS **32** (QuantaBio, 120 mg, 0,174 mmol) en DMSO (1 ml), seguida de 2,6-lutidina (37,3 mg, 0,348 mmol). La reacción se agitó a TA durante 3 h. Se añadió una solución de carbonato de bis(4-nitrofenilo) (63,5 mg, 0,209 mmol) en DMF (2 ml), seguida de 2,6-lutidina (37,3 mg, 0,348 mmol). Después, la reacción se agitó a TA durante 12 h. Después se añadió DIPEA (0,061 ml, 0,348 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 3 h. La mezcla del producto en bruto se diluyó con DMF, se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: acetonitrilo:agua 10:90 con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: acetonitrilo:agua 90:10 con TFA al 0,1 %; Gradiente: 0-70 % de B durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para proporcionar compuesto **33** (40 mg, 0,036 mmol, rendimiento del 20,54 %). CLEM (M+H) = 1119,5.

**Ejemplo 5 - Dímeros Ila-01 y Ila-05**

Este ejemplo y la **Fig. 6** se refieren a la síntesis del dímero **Ila-01**.

30 Una suspensión de fenol **22** (60 mg, 0,114 mmol), 2,6-bis(bromometil)piridina **34** (15 mg, 0,057 mmol, disponible en Sigma Aldrich) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (37 mg, 0,114 mmol) en acetona (0,4 ml) se calentó a 40 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 30-80 % en hexanos para proporcionar el dímero **35** (36,2 mg, rendimiento del 55 %). CLEM M+H = 1153,40.

35 Se disolvió el dímero **35** (36 mg, 0,031 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 1,9 ml, 0,078 mmol) y se añadió tetraquis(trifenilfosfina)paladio (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 2,2 mg, 1,9 μmol). La mezcla se agitó durante 30 minutos, momento en el que se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que después se purificó por HPLC preparativa (columna OBD preparativa Sunfire C18 19x100 mm; Disolvente A = 95 % de agua, 5 % de Acetonitrilo + TFA al 0,1 %; Disolvente B = 5 % de agua, 95 % de Acetonitrilo + TFA al 0,1 %; gradiente del 0-100 % durante 10 min; en lo sucesivo en el presente documento denominado "Procedimiento A de HPLC"). La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 45 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-01** en forma de un polvo de color blanco (13,4 mg, rendimiento del 56 %). CLEM M+H = 720,10. EMAR encontrado: M+H = 720,2808, calculado: 720,2817.

50 Usando 2,4-bis(bromometil)piridina en su lugar como resto de unión, se preparó de forma análoga dímero **Ila-05**.

Una suspensión de fenol **22** (170 mg, 0,414 mmol), 2,4-bis(bromometil)piridina (50 mg, 0,189 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (170 mg, 0,522 mmol) en DMF (1,0 ml) se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con 20 ml de agua y se filtró. El precipitado se lavó con dietil éter y se secó al aire. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona al 5-50 % en DCM para proporcionar compuesto Aloc-TBS análogo al dímero **35** (134 mg, rendimiento del 70 %). CLEM M+H = 1153,40.

60 El compuesto Aloc-TBS (36 mg, 0,031 mmol) se disolvió en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 1,9 ml, 0,078 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (2,2 mg, 1,9 μmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo que después se purificó mediante el Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua acuosa se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-05** en forma de un polvo de color blanco (16,0 mg, rendimiento del 65 %). CLEM M+H = 720,10.

**Ejemplo 6 - Dímero-enlazadores IIIb-01 y IIIb-02**

Este ejemplo y las **Fig. 7A** y **7B** en combinación se refieren a la preparación de dímero-enlazadores **IIIb-01** y **IIIb-02**.

Una suspensión de fenol **22** (480 mg, 0,823 mmol), 2,6-bis(bromometil)piridina **34** (654 mg, 2,47 mmol, disponible en Sigma Aldridge) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (500 mg, 1,54 mmol) en DMF (3,0 ml) se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se inactivó con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 30-80 % en hexanos para proporcionar compuesto **36** (465 mg, rendimiento del 80 %). CLEM M+H = 708,05.

Se disolvió silil éter **27** (431 mg, 0,486 mmol) en DMF (2,0 ml) y agua (0,04 ml) y se trató con LiOAc (32 mg, 0,486 mmol). La mezcla se calentó a 40 °C durante 2,5 h y se dejó agitar a TA durante una hora adicional. El disolvente se retiró en una corriente de  $\text{N}_2$  durante 3 días. El residuo se trató con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM para proporcionar fenol **37** (297 mg, rendimiento del 84 %). CLEM M+H = 730,40.

Se suspendieron fenol **37** (178 mg, 0,244 mmol), el compuesto **36** (190 mg, 0,268 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (79 mg, 0,244 mmol) en DMF (0,7 ml) y se calentaron a 40 °C durante 3,5 h. La mezcla se añadió a agua y se filtró para recoger el compuesto **38** en forma de un sólido de color blanco (320 mg, rendimiento del 97 %). CLEM M+H = 1357,30.

Se disolvió compuesto **38** (320 mg, 0,236 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 14 ml, 0,589 mmol) y se añadió  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (15 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla se agitó durante 2,5 h, momento en el que se repartió entre DCM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que después se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 10 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar la amina **39** en forma de un polvo de color blanco (145 mg, rendimiento del 58 %). CLEM M+Na = 1078,90.

Se disolvió amina **39** (145 mg, 0,137 mmol) en una solución de DIPEA en DMF (0,05 M, 3,3 ml, 0,165 mmol) y se añadió maleimida **40** (85 mg, 0,274 mmol, disponible en Sigma Aldridge). La mezcla se agitó durante 20 h, momento en el que se diluyó con DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 8 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-01** en forma de un polvo de color blanco (68 mg, rendimiento del **38** %). CLEM M+H = 1251,10.

Se disolvió dímero-enlazador **IIIb-01** (20,0 mg, 0,016 mmol) en THF (1 ml) y AcOH (0,1 ml) y se añadió una solución de  $\text{NaCNBH}_3$  (2,0 mg, 0,032 mmol) en MeOH (1 ml). La mezcla se agitó durante 1 h, momento en el que se diluyó con acetonitrilo y después se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-02** en forma de un polvo de color blanco (16 mg, rendimiento del **76** %). CLEM (M+2H)/2 = 627,10.

**Ejemplo 7 - Dímero Ila-02**

Este ejemplo y la **Fig. 8** se refieren a la preparación de dímero **Ila-02**.

Se disolvió aminal **20** (500 mg, 0,244 mmol) en DCM (10 ml) y se añadieron pirrolidina (0,18 ml, 2,21 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (51 mg, 44  $\mu\text{mol}$ ). La mezcla se agitó durante 45 min y se repartió entre DCM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo para proporcionar imina **41** (410 mg, rendimiento del 100 %), que se usó sin purificación adicional. CLEM M+H = 465,20.

Se disolvió imina **41** (410 mg, 0,882 mmol) en THF (8 ml) y ácido acético (0,8 ml) y se añadió una solución de  $\text{NaCNBH}_3$  (111 mg, 1,77 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h, se inactivó con  $\text{NaHCO}_3$  y se extrajo 3 veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron hasta obtener un

residuo para proporcionar amina **42** (315 mg, rendimiento del 77 %), que se usó sin purificación adicional. CLEM M+H = 467,30.

Se disolvió amina **42** (315 mg, 0,675 mmol) en DCM (7 ml) y se añadió piridina (0,15 ml, 1,86 mmol) y la mezcla se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota cloroformiato de alilo **12a** (0,10 ml, 1,39 mmol) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min, momento en el que se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl saturado y se extrajo 3 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo que se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 20-50 % en hexanos para proporcionar amina **43** protegida con aloc (372 mg, rendimiento del 100 %). CLEM M+H = 551,50.

Se trató amina **43** (372 mg, 0,675 mmol) de la misma manera que se usó para la preparación de fenol **37**, excepto porque la reacción se mantuvo a TA durante la noche en lugar de calentar. Esto proporcionó fenol **44** (249 mg, rendimiento del 93 %). CLEM M+H = 395,05.

Se suspendieron fenol **44** (30 mg, 0,076 mmol), el compuesto **36** (30 mg, 0,042 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 mg, 0,092 mmol) en DMF (0,25 ml) y se calentaron a 40 °C durante 1 h. La mezcla se trató con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 30-100 % en hexanos para proporcionar compuesto **45** (32 mg, rendimiento del 74 %). CLEM M+H = 1022,10.

Se disolvió compuesto **45** (32 mg, 0,031 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 2,0 ml, 0,08 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,8 mg, 1,6 μmol). La mezcla se agitó durante 2,5 h, después de lo cual se evaporó, se diluyó con DMF y después se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 3 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-02** en forma de un polvo de color blanco (12 mg, rendimiento del 53 %). CLEM M+H = 722,30.

### 30 Ejemplo 8 - Dímero Ila-03

Este ejemplo y la **Fig. 9** se refieren a la síntesis del dímero **Ila-03**.

En un matraz se añadió compuesto **6** (1,830 g, 4,03 mmol) en DMF (20 ml). A esto se le añadió 2,6-bis(bromometil)piridina **34** (3,2 g, 12,08 mmol) seguida de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,669 g, 12,08 mmol). La reacción se dejó transcurrir, con agitación, a temperatura ambiente durante la noche y después se interrumpió vertiéndola en agua. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc y se lavó con NaCl saturado. La fase orgánica se concentró hasta obtener un residuo y se purificó en una columna COMBIFLASH™, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 10 %-100 % en hexanos para producir compuesto **46** (2,3 g, rendimiento del 89 %) en forma de un sólido de color blanco.

En un matraz se combinaron compuesto **46** (1,0 g, 1,566 mmol) y compuesto **13** (1,084 g, 1,957 mmol) en DMF (5 ml). A esto se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,649 g, 4,70 mmol). Después de 4 h, la mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se concentró y se purificó en una columna COMBIFLASH™, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-100 % en hexanos para obtener compuesto **47** (856 mg, rendimiento del 49,2 %) en forma de un sólido de color blanco.

A un matraz se le añadió compuesto **47** (850 mg, 0,765 mmol) en DCM (10 ml). A esto se le añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (88 mg, 0,076 mmol) y pirrolidina (0,158 ml, 1,912 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en agua y DCM. La fase orgánica se recogió y se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se purificó en una columna COMBIFLASH™, eluyendo con MeOH al 0 %-30 en DCM para obtener compuesto **48** (500 mg, rendimiento del 63,6 %) en forma de un sólido de color blanco.

A una solución de compuesto **48** (26 mg, 0,025 mmol) en THF (1 ml) se le añadió SUPER HYDRIDE™ (0,127 ml, 0,127 mmol) a -76 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se detuvo con agua fría (1 ml) y se extrajo con DCM (10 ml, 3 veces). La capa orgánica se concentró y se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1,4 ml) y gel de sílice (1 g) durante 3 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 100 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de gel de sílice de 12 g usando 0-10 % de eluyente MeOH/DCM para proporcionar dímero **Ila-03** (16 mg, 0,021 mmol, rendimiento del 82 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 735,2.

### 60 Ejemplo 9 - Dímero-enlazadores IIlc-01, IIlc-03 y IIlc-04

Este ejemplo y la **Fig. 10** se refieren a la síntesis de dímero-enlazador **IIlc-01**, **IIlc-03** y **IIlc-04**.

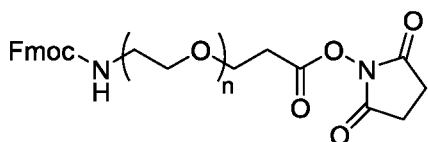
A una solución de compuesto **48** (1,15 g, 1,119 mmol), ácido **49** (0,667 g; 1,343 mmol; Firestone et al., documento US 6.214.345 B1 (2001)) y HATU (0,511 g, 1,343 mmol) en DMF (11 ml) a 0 °C se le añadió 2,6-lutidina (0,261 ml,

2,239 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. Después, la reacción se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con agua y después con salmuera. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 ml, 2 veces). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron y se recogieron en THF (20 ml). Se añadió piperidina (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró y se purificó en un ISCO COMBIFLASH™ (columna de 40 g, MeOH al 0-40 %/DCM) durante 32 minutos para proporcionar compuesto **50** (0,997 g, rendimiento del 69,4 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1284,6. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10,01 (s, 2H), 8,27 (m, 2H), 7,96 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 7,55 (m, 4H), 7,42 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 2H), 7,20-7,31 (m, 12H), 5,98 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 5,89 (sa, 1H), 5,43 (sa, 2H), 5,35 (sa, 1H), 5,25 (m, 8H), 5,10 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 5,09 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 4,95 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 4,75 (sa, 1H), 4,50 (sa, 2H), 4,32 (m, 6H), 4,09 (c, J = 5,2 Hz, 4H), 3,83 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,40 (c, J = 7,6 Hz, 1H), 3,17 (d, J = 5,2 Hz, 8H), 3,00 (m, 10H), 2,68 (t, J = 1,6 Hz, 1H), 2,33 (t, J = 1,6 Hz, 2H), 1,97 (m, 3H), 1,63 (m, 10H), 1,42 (m, 6H), 0,91 (d, J = 7,2 Hz, 3H), 0,84 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,75 (m, 4H), 0,08 (s, 18H).

A una solución de compuesto **50** (322 mg, 0,251 mmol) en THF (10 ml) a -76 °C se le añadió SUPER HYDRIDE™ (1,254 ml, 1,254 mmol) y se agitó durante 1 h. La reacción se interrumpió con agua fría (1 ml) y se concentró. El residuo resultante se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1 = 8 ml) y gel de sílice (1 g) durante 2 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 100 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de gel de sílice de 24 g usando 0-50 % de eluyente MeOH/DCM durante 15 min para proporcionar compuesto **51** (248 mg, rendimiento del 90 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 991,4.

A una solución de compuesto **51** (88 mg, 0,089 mmol) y compuesto **40** (54,7 mg, 0,178 mmol) en DMSO (6 ml) se le añadió DIPEA (0,031 ml, 0,178 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 45 min. La mezcla de reacción se purificó por R-HPLC usando una columna XBridge prep OBD C18, 5 μm (150 mm, 30 veces) y gradiente de elución de acetonitrilo al 5-60 %/agua (ácido fórmico al 0,05 %) durante 30 min. Una fracción recogida a los 16,9 min se filtró a través de una resina básica (PL-HCO<sub>3</sub> MP - Resina 1,8 mmol/g; Pieza Agilent n.º PL3540 - n.º 603), se lavó con acetonitrilo (5 ml) y se liofilizó para proporcionar dímero-enlazador **IIIc-01** (39,1 mg, 0,031 mmol, rendimiento del 35,0 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1184,3

Se prepararon de forma análoga dímero-enlazadores **IIIc-03** y **IIIc-04** a partir de compuesto **51** y dímero **Ila-03**, respectivamente usando la N-hidroxisuccinimida protegida con Fmoc apropiada a continuación, seguido de la retirada del grupo Fmoc con piperidina.



CAS Reg. No. 1314378-14-7, n = 4  
CAS Reg. No. 1334170-03-4, n = 8

El dímero-enlazador **IIIc-03** tiene un enlazador terminado con un grupo amino y, por tanto, puede ser el componente donador de amina en una conjugación mediada por transglutaminasa. EM (m+1) = 1414,5.

El dímero-enlazador **IIIc-04** también tiene un enlazador terminado con un grupo amino y, por tanto, puede ser el componente donador de amina en una conjugación mediada por transglutaminasa. Al carecer de un grupo peptídico, el dímero-enlazador **IIIc-04** es del tipo no escindible, ya que depende de la degradación del anticuerpo al que está unido para liberar el dímero-fármaco. EM (m+1) = 982,53.

#### Ejemplo 10 - Dímero Ila-04

Este ejemplo y la **Fig. 11** se refieren a la síntesis del dímero **Ila-04**.

Se combinaron 2,6-bis(bromometil)piridina **34** (4,31 g, 16,25 mmol), compuesto **13** (1,8 g, 3,25 mmol) y DMF (20 ml) en un matraz. A esto se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,899 g, 6,50 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y se vertió en agua (200 ml) y EtOAc (200 ml). La capa orgánica se lavó con agua (100 ml) y salmuera (50 ml) y se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se purificó en una columna COMBIFLASH™ de 80 g eluyendo con EtOAc al 0-100 % en elución por gradiente de hexanos durante 30 min para obtener el compuesto **52** (1,409 g, 1,910 mmol, rendimiento del 58,8 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 737,1. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,80 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 7,45 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,37 (s, 2H), 7,28 (m, 4H), 6,62 (s, 1H), 5,98 (m, 1H), 5,42 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 5,37 (m, 1H), 5,28 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 5,12 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,69 (d, J = 6 Hz, 1H), 4,65 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 4,61 (s, 1H), 4,42 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,27 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,65 (m, 2H), 3,51 (dd, J = 15,6, 7,2 Hz, 1H), 2,97 (dd, J = 15,6, 6,4 Hz, 1H), 0,97 (m, 2H), 0,04 (s, 9H).

A una solución de compuesto **6** (2 g, 4,40 mmol) en THF (20 ml) se le añadió SUPER HYDRIDE™ (22,00 ml, 22,00 mmol) a -76 °C. La mezcla de reacción se agitó a esa temperatura durante 1 h. La reacción se interrumpió con

agua fría (100 ml) y se extrajo con DCM (100 ml, 3 veces). El residuo resultante se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1 = 40 ml) y gel de sílice (10 g) durante 3 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 100 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de gel de sílice de 40 g usando MeOH/DCM durante 15 min. La fracción de MeOH al 10 %/DCM a los 10 min proporcionó compuesto **53** (1,35 g, 4,03 mmol, rendimiento del 92 %) en forma de un sólido de color amarillo. EM (m+1) = 309,0.

A una solución de compuesto **52** (1,265 g, 1,715 mmol) y compuesto **53** (0,582 g, 1,886 mmol) en DMSO (10 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,474 g, 3,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se vertió en agua y EtOAc (1:1, 300 ml). La capa orgánica se concentró y se purificó en una columna de gel de sílice de 40 g usando elución con MeOH/DCM durante 15 min para proporcionar compuesto **54** (1,78 g, 1,568 mmol, rendimiento del 91 %) en forma de un sólido de color amarillo. EM (m+1) = 965,3.

A una solución de compuesto **54** (1,78 g, 1,844 mmol) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,107 g, 0,092 mmol) en DCM (30 ml) se le añadió pirrolidina (0,305 ml, 3,69 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. La concentración y purificación en una columna de gel de sílice de 40 g usando elución con MeOH/DCM durante 15 min para proporcionar compuesto **55** (1,54 g, 1,748 mmol, rendimiento del 95 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 881,2.

A una solución de compuesto **55** (100 mg, 0,113 mmol) en THF (2 ml) se le añadió una gota de ácido acético seguido de NaCNBH<sub>3</sub> (14,27 mg, 0,227 mmol) en MeOH (0,2 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 20 min, se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) y salmuera (10 ml). La capa orgánica se concentró y se purificó en una columna ISCO COMBIFLASH™ de 24 g usando MeOH/DCM durante 15 min para proporcionar compuesto **56** (37 mg, 0,042 mmol, rendimiento del 36,9 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 883,4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,45 (m, 3H), 7,35 (s, 1H), 7,28 (m, 4H), 7,20 (m, 1H), 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,61 (m, 2H), 6,13 (s, 1H), 5,44 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 5,28 (m, 4H), 5,09 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,81 (c, J = 15,6 Hz, 2H), 4,63 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 4,25 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,18 (dd, J = 8,0, 6,8 Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,71 (m, 3H), 3,41 (m, 2H), 3,21 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 3,09 (dd, J = 15,2, 5,6 Hz, 1H), 2,83 (m, 2H), 0,98 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

A una solución de compuesto **56** (37 mg, 0,042 mmol) en THF (2 ml) se le añadió SUPER HYDRIDE™ (0,209 ml, 0,209 mmol) a -76 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y se inactivó con agua fría (1 ml) y se extrajo con DCM (10 ml, 3 veces). La capa orgánica se concentró y se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1, 4 ml) y gel de sílice (1 g) durante 3 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 50 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de gel de sílice de 12 g usando elución con MeOH al 0-10 %/DCM durante 15 min para proporcionar dímero **Ila-04** en forma de un sólido de color blanco (25,3 mg, rendimiento del 78 %). EM (m+1) = 737,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,70 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,43 (m, 3H), 7,28 (m, 3H), 7,23 (m, 1H), 7,12 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,62 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,32 (m, 3H), 4,80 (m, 2H), 4,40 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,90 (s, 3H), 3,50 (s, 1H), 3,14 (m, 2H), 2,97 (m, 3H), 2,75 (dd, J = 15,2, 5,6 Hz, 2H).

#### Ejemplo 11 - Dímero enlazador IIIc-02

Este ejemplo y las Fig. 12A y 12B se refieren a la síntesis de dímero-enlazador IIIc-02.

Se añadió 2,6-lutidina (0,323 ml, 2,77 mmol) a una solución de compuesto **55** (1,22 g, 1,385 mmol), compuesto **49** (0,825 g, 1,662 mmol) y HATU (0,632 g, 1,662 mmol) en DMF (20 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h, momento en el que el análisis por CLEM mostró la conversión completa en producto. La mezcla de reacción se vertió en un embudo separador que contenía EtOAc (300 ml) y agua (100 ml). Se añadió salmuera (50 ml) para separar en dos capas. La capa orgánica se concentró y se purificó en una columna ISCO COMBIFLASH™ de 120 g, elución con MeOH al 0-30 %/DCM durante 25 min para producir compuesto **56** (1,13 g, 0,831 mmol, rendimiento del 60,0 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1359,4.

Se añadió ácido acético (0,095 ml, 1,662 mmol) a una solución de compuesto **56** (1,13 g, 0,831 mmol) en THF (30 ml), seguido de NaCNBH<sub>3</sub> (0,104 g, 1,662 mmol) en MeOH (3 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h, se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) y salmuera (50 ml). La capa orgánica se concentró y se purificó en una columna ISCO COMBIFLASH™ de 80 g, eluyente MeOH al 0-20 %/DCM durante 25 min para producir compuesto **57** (1 g, 0,734 mmol, rendimiento del 88 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+Na) = 1384,2

Se añadió piperidina (2 ml, 20,20 mmol) a una solución de compuesto **57** (1 g, 0,734 mmol) en THF (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó en una columna ISCO CoMBIFLASH™ de 40 g, eluyente MeOH al 0-50 %/DCM durante 25 min para proporcionar compuesto **58** (0,7 g, 0,614 mmol, rendimiento del 84 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1139,4.

A una solución de compuesto **58** (0,5 g, 0,439 mmol) en THF (10 ml) a -76 °C se le añadió SUPER HYDRIDE™ (4,39 ml, 4,39 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 45 min. La reacción se interrumpió con agua fría (1 ml)

y se concentró. El residuo resultante se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1, 8 ml) y gel de sílice (2 g) durante 2 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 200 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna ISCO de 80 g de gel de sílice (Oro) usando MeOH/DCM durante 40 min para proporcionar compuesto **59** (0,4 g, 0,403 mmol, rendimiento del 92 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 993,4.

A una solución de compuesto **59** (24 mg, 0,024 mmol) y compuesto **84** (14,90 mg, 0,048 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadió DIPEA (8,44 µl, 0,048 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por R-HPLC usando XBridge prep OBD C18, columna de 5 µm (30x250 mm) y acetonitrilo al 5-60 %/agua (ácido fórmico al 0,05 %) durante 30 min. Una fracción recogida a los 20,3 min se filtró a través de una resina básica (PL-HCO3 MP - Resina 1,8 mmol/g; Pieza Agilent n.º PL3540 - n.º 603) y se lavó con acetonitrilo (5 ml). La liofilización proporcionó dímero-enlazador **IIIc-02** (7,6 mg, 6,21 µmol, rendimiento del 25,7 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1186,5.

#### 15 **Ejemplo 12 - Dímero-enlazadores IIIb-03 y IIIb-03'**

Este ejemplo y la **Fig. 13** se refieren a la síntesis del dímero-enlazador **IIIb-03**.

A piridina-2,4-diildimetanol (80 mg, 0,572 mmol) en THF (2 ml) se le añadió fenol **22** (100 mg, 0,191 mmol), trifenilfosfina unida a polímero (200 mg, 0,629 mmol) y azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 0,122 ml, 0,629 mmol). La reacción se agitó 12 h a 25 °C y la mezcla se filtró. El disolvente se retiró y el material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona al 20-100 % en DCM para proporcionar los compuestos **61** (70 mg, rendimiento del 56,9 %) CLEM M+H = 646,45 y **62** (50 mg, rendimiento del 40,6 %) CLEM M+H = 646,40.

Al compuesto **61** (67 mg, 0,104 mmol) y TEA (0,036 ml, 0,259 mmol) en DCM (2 ml) se les añadió cloruro de metanosulfonilo (MsCl, 0,019 ml, 0,239 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h y se inactivó con agua. La mezcla se extrajo con DCM, se lavó con HCl ac. frío (0,05 N), salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para proporcionar compuesto **63** en forma de un aceite de color naranja. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-100 % en hexano para proporcionar compuesto purificado **63** (40 mg, rendimiento del 30 %) CLEM M+H = 724,10.

Al compuesto **63** (40 mg, 0,055 mmol) en DMF (0,1 ml) se le añadieron Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mg, 0,123 mmol) y compuesto **37** (40,3 mg, 0,055 mmol). La reacción se agitó 4 h a 25 °C y el material se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar compuesto **64** en forma de un polvo de color blanco (16,0 mg, rendimiento del 65 %). CLEM M+H = 1357,65.

Se disolvió compuesto **64** (15 mg, 0,011 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,658 ml, 0,028 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,766 mg, 0,663 µmol). La mezcla se agitó durante 2,5 h a TA y el disolvente de reacción se retiró en N<sub>2</sub>. El material restante se diluyó con 1,5 ml de DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar la amina **65** en forma de un polvo de color blanco (11,5 mg, rendimiento del 98 %). CLEM M+Na = 1080.

Se disolvió amina **65** (11,5 mg, 10,88 µmol) en una solución de DIPEA en DMF (0,261 ml, 0,013 mmol) y se añadió compuesto **40** (6,71 mg, 0,022 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h, se diluyó con DMF y se purificó por HPLC preparativa como se ha descrito en el párrafo anterior. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-03** en forma de un polvo de color blanco (3 mg, 2,231 µmol, rendimiento del 20,51 %). CLEM M+H = 1250,60.

Puede prepararse dímero-enlazador **IIIb-03'** de manera análoga a partir de compuesto **62**.

#### 60 **Ejemplo 13 - Dímero IIa-06**

Este ejemplo y la **Fig. 14** se refieren a la preparación de dímero **IIa-06**.

A piridina-3,5-diildimetanol **66** (26,5 mg, 0,191 mmol) en THF (2 ml) se le añadió fenol **22** (100 mg, 0,191 mmol), trifenilfosfina unida a polímero (200 mg, 0,629 mmol) y DIAD (0,122 ml, 0,629 mmol). La reacción se agitó 12 h a

25 °C y la mezcla se filtró. El disolvente se retiró y el material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona al 20-100 % en DCM para proporcionar dímero **67** (55 mg, rendimiento del 15,02 %) CLEM M+Na = 1174,65 y compuesto **68** (38 mg, rendimiento del 31 %) CLEM M+H = 646,30.

5 Se disolvió dímero **67** (15 mg, 0,013 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,775 ml, 0,033 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1 mg, 0,865 μmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se  
10 combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-06** en forma de un polvo de color blanco (2 mg, rendimiento del 20,28 %). CLEM M+H = 721,30.

#### 15 **Ejemplo 14 - Dímero-enlazador IIIb-04**

Este ejemplo y la **Fig. 15** se refieren a la síntesis del dímero-enlazador **IIIb-04**.

Una suspensión de fenol **22** (200 mg, 0,381 mmol), clorhidrato de 3,5-bis(clorometil)piridina (250 mg, 1,176 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (800 mg, 2,455 mmol) en DMF (1,0 ml) se agitó a 25 °C durante 16 h. El disolvente se retiró en nitrógeno. El residuo se cargó en seco sobre CELITE™ y se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de MeOH al 2-10 % en DCM para proporcionar dímero **69** (120 mg, rendimiento del 47 %). CLEM M+Na = 687,05.

Al compuesto **37** (150 mg, 0,206 mmol) en DMF (1,0 ml) se le añadieron Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 mg, 0,307 mmol) y dímero **69** (150 mg, 0,206 mmol). La reacción se agitó 12 h a 25 °C y el material se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar compuesto **70** en forma de un polvo de color blanco (42 mg, rendimiento del 15,65 %). CLEM M+H = 1357,65.

Se disolvió compuesto **70** (40 mg, 0,029 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 1,8 ml, 0,074 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (2,0 mg, 1,768 μmol). La mezcla se agitó durante 2,5 h a TA y el disolvente de reacción se retiró en N<sub>2</sub>. El material se diluyó con 1,5 ml de DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar la amina **71** en forma de un polvo de color blanco (15 mg, rendimiento del 43 %). CLEM M+Na = 1080.

Se disolvió amina **71** (15 mg, 10,88 μmol) en una solución de DIPEA en DMF (0,615 ml, 0,031 mmol) y se añadió compuesto **40** (25 mg, 0,024 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h, se diluyó con DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-04** en forma de un polvo de color blanco (10 mg, rendimiento del 30 %). CLEM M+H = 1250,60.

#### 50 **Ejemplo 15 - Dímero Ila-08**

Este ejemplo y la **Fig. 16** se refieren a la preparación de dímero **Ila-08**.

A 4-(hidroximetil)piridin-2,6-dicarboxilato de dimetilo **72** (200 mg, 0,888 mmol) en DMF (0,888 ml) se le añadieron imidazol (100 mg, 1,469 mmol) y cloruro de t-butildimetilsililo (TBS-Cl, 4 ml, 1,149 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante la noche. El disolvente se retiró en nitrógeno y el material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 0-50 % en hexano para proporcionar compuesto **73** (290 mg, rendimiento del 91 %). CLEM M+H = 340,50.

Al compuesto **73** (14 g, 0,412 mmol) en etanol (2 ml) se le añadió LiBH<sub>4</sub> (0,054 g, 2,475 mmol). La reacción se agitó durante 5 h a 25 °C. La reacción se interrumpió con ácido acético (0,189 ml, 3,30 mmol) y se agitó 10 min. El disolvente se retiró y el material se cargó en seco sobre CELITE™. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 2-10 % en DCM para proporcionar compuesto **74** (120 mg, rendimiento del 98 %). CLEM M+H = 284,50.

65 A una suspensión de compuesto **74** (100 mg, 0,353 mmol), TEA (0,123 ml, 0,882 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió MsCl (0,063 ml, 0,811 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. Después, la reacción se interrumpió

con agua, se extrajo con DCM, se lavó con HCl ac. frío (0,05 N), salmuera, y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró para proporcionar el mesilato **75** en forma de un aceite de color naranja. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-100 % en hexano para proporcionar mesilato **75** (155 mg, rendimiento del 98 %). CLEM M+H = 440,30.

5 Al mesilato **75** (25 mg, 0,057 mmol) en DMF (0,3 ml) se le añadieron Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (85 mg, 0,261 mmol) y fenol **22** (90 mg, 0,171 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante 1 h. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona al 30-100 % en DCM para proporcionar dímero **76** (70 mg, rendimiento del 93 %). CLEM M+H = 1296,65.

10 Al dímero **76** (40 mg, 0,031 mmol) en THF (0,3 ml) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF, 0,037 ml, 0,037 mmol). La reacción se completó en 30 min y se interrumpió con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturado. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró, se diluyó con DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **77** en forma de un polvo de color blanco (14 mg, rendimiento del 47 %). CLEM M+H = 954,35.

20 Se disolvió el dímero **77** (14 mg, 0,012 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,705 ml, 0,030 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,0 mg, 0,9 μmol). La mezcla se agitó durante 1 h y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-08** en forma de un polvo de color blanco (5,0 mg, rendimiento del 54 %). CLEM M+H = 750,30.

### 30 Ejemplo 16 - Dímero-enlazador IIIb-05

Este ejemplo y la **Fig. 17** se refieren a la preparación del dímero-enlazador **IIIb-05**.

35 Al compuesto **75** (113 mg, 0,257 mmol) en DMF (0,2 ml) se le añadieron fenol **22** (45 mg, 0,086 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 mg, 0,184 mmol). La reacción se agitó a 25 °C durante 1 h. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 30-100 % en DCM para proporcionar dímero **78** (40 mg, rendimiento del 30,6 %). CLEM M+H = 868,60.

40 Al dímero **78** (39 mg, 0,045 mmol) en DMF (0,2 ml) se le añadieron Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mg, 0,123 mmol) y compuesto **37** (40 mg, 0,055 mmol). La reacción se agitó 4 h a 25 °C y el material se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre.

45 La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar compuesto **79** en forma de un polvo de color blanco (60,0 mg, rendimiento del 89 %). CLEM M+H = 1501,85.

50 Al dímero **79** (60 mg, 0,040 mmol) en THF (0,4 ml) se le añadió TBAF (0,04 ml, 0,040 mmol). La reacción se completó en 30 min y se interrumpió con NH<sub>4</sub>Cl saturado. La mezcla se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró, se diluyó con DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **80** en forma de un polvo de color blanco (13 mg, rendimiento del 20 %). CLEM M+H = 1273,55.

60 Se disolvió compuesto **80** (13 mg, 10,21 μmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,608 ml, 0,026 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,708 mg, 0,613 μmol). La mezcla se agitó durante 2,5 h a TA. El disolvente de reacción se retiró en N<sub>2</sub>. El material se diluyó con 1,5 ml de DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar la amina **81** en forma de un polvo de color blanco (11 mg, rendimiento del 90 %). CLEM M+H = 1087,50.

65 Se disolvió amina **81** (11 mg, 10,12 μmol) en una solución de DIPEA en DMF (0,243 ml, 0,012 mmol) y se añadió



compuesto **40** (6,24 mg, 0,020 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h y se diluyó con DMF y se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en 2 inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-04** en forma de un polvo de color blanco (6 mg, rendimiento del 42 %). CLEM M+H = 1281,60.

#### Ejemplo 17 - Dímeros Ila-07 y Ila-09

Este ejemplo y la Fig. 18 se refieren a la preparación de dímeros **Ila-07** y **Ila-09**

A una suspensión de (3-metoxipiridina-2,6-diil)dimetanol **82** (90 mg, 0,532 mmol), NEt<sub>3</sub> (0,185 ml, 1,330 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió MsCl (0,095 ml, 1,224 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La reacción se interrumpió con agua, se extrajo con DCM, se lavó con HCl ac. frío (0,05 N), salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para proporcionar el mesilato en bruto en forma de un aceite de color naranja. El material se purificó por cromatografía, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-100 % en hexano para proporcionar compuesto **83** (87 mg, rendimiento del 45 %). CLEM M+Na = 347,75.

Una suspensión de fenol **22** (97 mg, 0,184 mmol), compuesto **83** (20 mg, 0,061 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 mg, 0,184 mmol) en DMF (0,3 ml) se agitó a 25 °C durante 3 h. El disolvente se retiró en nitrógeno. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de metanol al 2-10 % en DCM para proporcionar dímero **84** (67 mg, rendimiento del 77 %). CLEM M+H = 1183,02.

Se disolvió el dímero **84** (20 mg, 0,017 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 1,0 ml, 0,042 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,0 mg, 1,0 μmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo que se purificó mediante el Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-09** en forma de un polvo de color blanco (3,0 mg, rendimiento del 22 %). CLEM M+H = 750,30.

A una suspensión de quinolina-2,4-diildimetanol **85** (100 mg, 0,529 mmol), NEt<sub>3</sub> (0,185 ml, 1,330 mmol) en DCM (3 ml) se le añadió MsCl (0,095 ml, 1,224 mmol) a 0 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 1 h. La reacción se interrumpió con agua, se extrajo con DCM, se lavó con HCl ac. frío (0,05 N), salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró para proporcionar el mesilato en bruto en forma de un aceite de color naranja. El material se purificó por cromatografía, eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-100 % en hexano para proporcionar compuesto **86** (80 mg, rendimiento del 44 %). CLEM M+Na = 345,80.

Una suspensión de fenol **22** (182 mg, 0,347 mmol), compuesto **86** (40 mg, 0,116 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (113 mg, 0,347 mmol) en DMF (0,3 ml) se agitó a 25 °C durante 3 h. El disolvente se retiró en nitrógeno. El material se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de acetona al 30-100 % en DCM para proporcionar dímero **87** (95 mg, rendimiento del 68 %). CLEM M+H = 1202,60.

Se disolvió el dímero **87** (20 mg, 0,017 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,4 ml, 0,017 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,0 mg, 1,0 μmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que se purificó por Procedimiento A de HPLC. La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-07** en forma de un polvo de color blanco (8,0 mg, rendimiento del 59 %). CLEM M+H = 770,30.

#### Ejemplo 18 - Intermedios adicionales

Se sintetizaron dibromuros **91a-d**, útiles para la síntesis de dímeros de la presente invención, de acuerdo con el esquema de la Fig. 19A. Los materiales de partida **88a** y **88b** se prepararon como se describe en *Synth. Commun.* 1999, 3719. El material de partida **88c** se obtuvo en Arkpharma. El material de partida **89d** se preparó como se describe en el documento WO 2012/153253.

El siguiente procedimiento para la preparación del intermedio **88a** es representativo.

Se suspendió metil éter **88a** (0,45 g, 2,0 mmol) en etanol (20 ml) y se añadió borohidruro de litio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h y después se inactivó mediante la adición de ácido acético. La mezcla se

evaporó y se purificó por cromatografía en gel de sílice con un gradiente de metanol al 0-20 % en DCM para proporcionar el diol **89a** (210 mg, rendimiento del 62 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6,87 (s, 2H), 5,33 (t a, J = 5,5 Hz, 2H), 4,47 (d a, J = 4,9 Hz, 4H), 3,84 (s, 3H).

5 Se suspendieron diol **89a** (0,21 g, 1,24 mmol) y trietilamina (0,52 ml, 3,72 mmol) en DCM (6,2 ml) y se enfriaron en un baño de hielo/agua. A esta mezcla se le añadió MsCl (0,22 ml, 2,85 mmol). La mezcla de reacción se dejó transcurrir durante 2 h a la misma temperatura, después se inactivó mediante la adición de agua y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas se lavaron con HCl 0,1 N, seguido de salmuera y después se secaron sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el mesilato **90a** en bruto (0,4 g, se supone un rendimiento del 100 %) que se usó en la etapa posterior sin purificación adicional. CLEM M+H = 325,85.

15 Se disolvió mesilato **90a** (0,44 g, 1,35 mmol) en DMF (2,7 ml) y se añadió bromuro de sodio (696 mg, 6,76 mmol). La mezcla se agitó durante 3 h, momento en el que se diluyó con agua y los sólidos resultantes se recogieron por filtración y se secaron al vacío para proporcionar dibromuro **91a** (0,155 g, rendimiento del 39 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 6,92 (s, 2H), 4,51 (s, 4H), 3,91 (s, 3H). CLEM M+H = 293,70.

Se sintetizaron dibromuros **91b-d** de forma análoga:

20 **91b**: CLEM M+H = 319,70.

**91c**: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,42 (s, 2H), 4,51 (s, 4H).

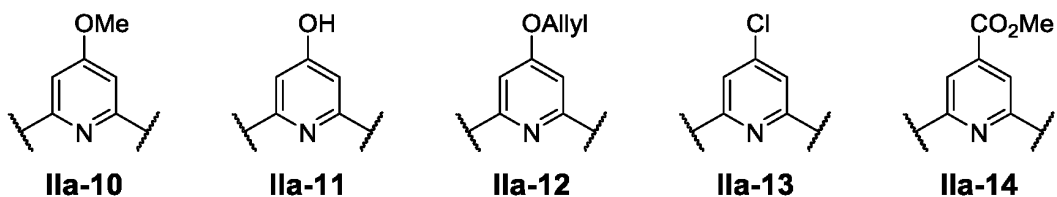
**91d**: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,95 (s, 2H), 4,61 (s, 4H), 4,06 - 3,94 (m, 3H).

#### 25 Ejemplo 19 - Dímeros **Ila-10**, **Ila-11**, **Ila-12**, **Ila-13** y **Ila-14**.

El compuesto **20** se convirtió en el compuesto **92** por tratamiento con LiOAc como se muestra en la Fig. 19B. El compuesto **92** se acopló con dibromuros **91a-d** para proporcionar dímeros protegidos, que después se desprotegeron con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> para producir los dímeros **Ila-10** a **Ila-14**, siguiendo de manera análoga los procedimientos del Ejemplo 5 y el esquema de la Fig. 6.

30 **(Ila-10)**: CLEM M+H = 750,05.  
**(Ila-11)**: CLEM M+H = 736 (obtenido por pérdida del grupo alilo en la etapa de desprotección que conduce al dímero **Ila-12**).  
**(Ila-12)**: CLEM M+H = 776,05.  
**(Ila-13)**: CLEM M+H = 754,00.  
**(Ila-14)**: CLEM M+H = 778,05.

Los dímeros **(Ila-10)** a **(Ila-14)** difieren en la naturaleza del resto de unión, como se resume a continuación:

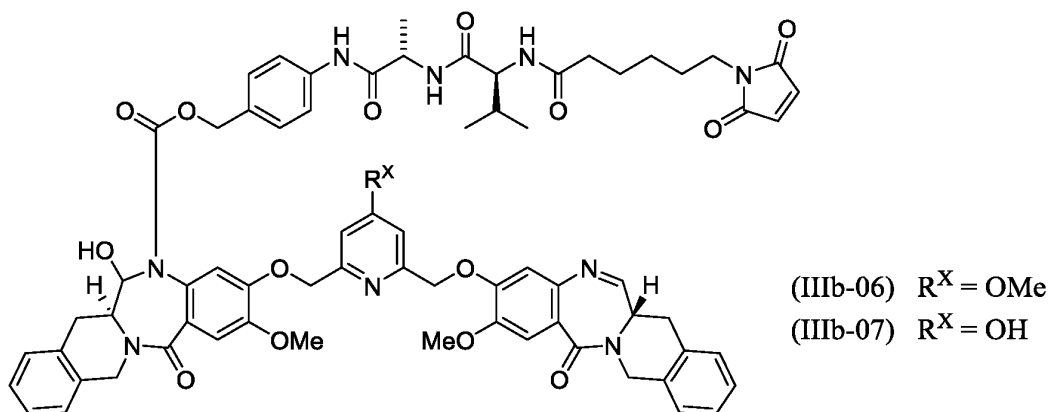


#### 45 Ejemplo 20 - Dímero-enlazadores **IIIb-06** y **IIIb-07**

Se prepararon dímero-enlazadores **IIIb-06** y **IIIb-07** a partir de compuesto **22** y dibromuros **91a** y **91b**, respectivamente, siguiendo de manera análoga los procedimientos del Ejemplo 14 y el esquema de la Fig. 15.

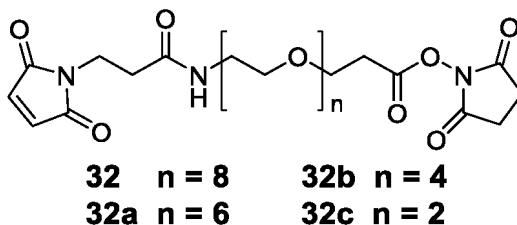
**(IIIb-06)**: CLEM M+Na = 1302,05.

**(IIIb-07)**: CLEM M+H = 1267.



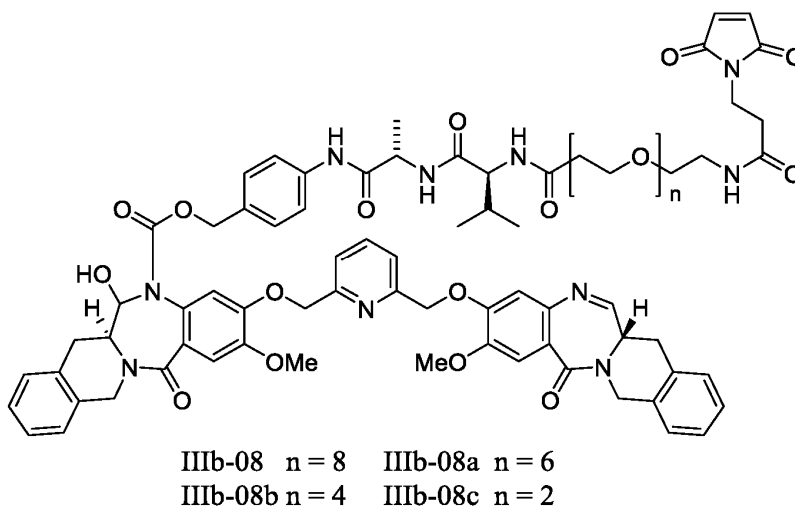
### Ejemplo 21 - Dímero-enlazadores IIIb-08, IIIb-08a, IIIb-08b y IIIb-08c

- 5 Este ejemplo se refiere a la preparación de dímeros-enlazadores que tienen un resto de poli(etilenglicol) (PEG) en el enlazador. La presencia del resto PEG puede mejorar la solubilidad del dímero-enlazador durante la conjugación en un medio acuoso.



- 10 Los compuestos de maleimida **32** y **32a-b** (todos disponibles en Quanta Biodesign) se acoplaron a la amina **39** (Ejemplo 6 y Fig. 7B) para preparar los dímeros-enlazadores **IIIb-08**, **IIIb-08a**, **IIIb-08b**, y **IIIb-08c**, respectivamente:

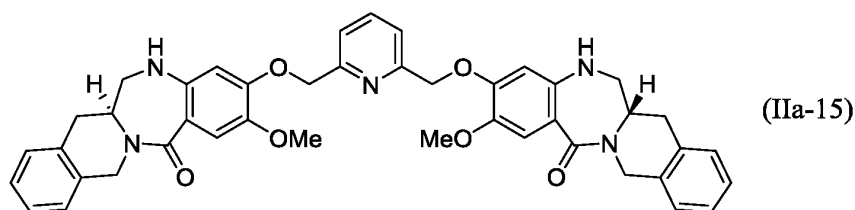
- 15 **IIIb-08**: CLEM  $(M+2H)/2 = 816,55$ .  
**IIIb-08a**: CLEM  $(M+2H)/2 = 772,50$ .  
**IIIb-08b**: CLEM  $(M+2H)/2 = 728,40$ .  
**IIIb-08c**: CLEM  $M+Na = 1390,05$ .



### 20 Ejemplo 22 - Dímero IIa-15

Este ejemplo se refiere a la preparación de dímero **IIa-15**, en el que se han reducido ambos grupos imina en los anillos de diazepina.

- 25 De forma análoga, siguiendo los procedimientos del Ejemplo 5 y el esquema de la Fig. 5, se acopló dibromuro **34** a compuesto **44** para producir un compuesto de bis-aloc. La desprotección de este último con  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  produjo dímero **IIa-15**. CLEM  $M+H = 724,45$ .



### Ejemplo 23 - Dímero-enlazador IIIb-09

Este ejemplo y la Fig. 20 se refieren a la preparación de dímero-enlazador **MIIb-09**, en el que el enlazador tiene un grupo amino como grupo funcional reactivo. El grupo amino puede participar en la conjugación actuando como un donador de amina en la conjugación mediada por transglutaminasa, como se ha analizado anteriormente en el presente documento.

Se usaron compuesto Aloc **44**, dibromuro **34** y compuesto **37** para preparar compuesto **93**, siguiendo en general los procedimientos de los Ejemplos 6 y 14, y los esquemas de las Fig. 7A-7B y 15 asociadas respectivamente.

Se acopló compuesto **94** (0,079 g, 0,086 mmol, Quanta Biodesign) con compuesto **93** (0,091 g, 0,095 mmol) de forma análoga siguiendo los procedimientos del Ejemplo 6 y la Fig. 7B para producir compuesto **95** (40 mg, rendimiento del 27 %). CLEM (M+2H)/2 = 853,45. Se disolvió compuesto **95** (40 mg, 0,023 mmol) en DMF (1,0 ml) y se añadió dietilamina (0,1 ml, 0,957 mmol). La mezcla se envejeció durante 1 h, se diluyó con DMF y se purificó por columna Biotage C18, Disolvente A = 95 % de agua, 5 % de acetonitrilo + 0,05 % de ácido fórmico; Disolvente B = 5 % de agua, 95 % de acetonitrilo + 0,05 % de ácido fórmico; gradiente del 20-100 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO3-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador **IIIb-09** en forma de un polvo de color blanco (18,5 mg, rendimiento del 51 %). CLEM (M+2H)/2 = 742,35.

### Ejemplo 24 - Intermedios adicionales

Este ejemplo y la Fig. 21 se refieren a la síntesis de intermedios adecuados para la síntesis de dímeros THIQ-THIQ que tienen un nitrógeno adicional en un anillo aromático.

Se disolvió hidruro de sodio (60 %, 2,72 g, 56,8 mmol) en DMF (50 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió en porciones acetamidomalonato de dietilo **97** (6,17 g, 28,4 mmol) durante aproximadamente 3 min y se hizo reaccionar 10 min adicionales hasta que disminuyó la formación de burbujas. Se añadió piridina **96** (5 g, 28,4 mmol, preparada según el documento WO 2002/036555) en el transcurso de aproximadamente 1 min. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. Se formaron dos regioisómeros **98a/b** y se usaron como una mezcla sin purificación adicional en la siguiente etapa (7,2 g, rendimiento del 79 %). CLEM M+H = 321,10 (2 picos con la misma masa).

Una mezcla de compuestos **98a/b** (7,2 g, 22,48 mmol) se trató con HCl 6 N (50 ml, 1646 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 h. Después de haberse enfriado a TA, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El sólido de color marrón que se formó se concentró junto con dioxano y se trituró con metanol. Se recogieron dos cultivos de una mezcla de compuestos **99a/b**, el primero fue 2,4 g de un sólido de color castaño y un segundo cultivo de 1,0 g de un sólido de color marrón oscuro. Estos se usaron sin purificación adicional.

Se añadieron sucesivamente MeOH (20 ml) y cloruro de tionilo (1,578 ml, 21,62 mmol) a temperatura ambiente a una mezcla de compuestos **99a/b** (1810 mg, 7,21 mmol) y después la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró completamente. El sólido formado se volvió a concentrar con dioxano para retirar el exceso de cloruro de tionilo para obtener un sólido de color marrón. La mezcla se trituró con MeOH para proporcionar un sólido que se repartió entre Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y DCM y se extrajo 2 veces más. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó para proporcionar una mezcla de compuestos **100a/b** (1,2 g, 6,24 mmol, rendimiento del 87 %).

Una mezcla de compuestos **100a/b** (1,2 g, 6,24 mmol) se disolvió en MeOH (50 ml) y se trató con LiBH<sub>4</sub> (0,136 g, 6,24 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h, se evaporó y se formó un azeótropo con etanol y tolueno para proporcionar una mezcla de compuestos **101a/b** (1 g, rendimiento del 98 %).

Una mezcla de compuestos **101a/b** (1,0 g, 6,09 mmol) se disolvió en DMF (1 ml) y acetonitrilo (5,8 ml) y se trató con TBS-Cl (3,15 ml, 2,9 M, 9,13 mmol) e imidazol (0,62 g, 9,13 mmol). La mezcla se dejó reposar durante 20 min y la mayor parte del disolvente se evaporó. El residuo se repartió entre agua y EtOAc. La fase acuosa se extrajo 3 veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla se filtró

para retirar los sólidos y el disolvente se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía ultrarrápida con MeOH al 0-10 %/DCM en una columna de gel de sílice de 24 g. En estas condiciones, los 2 componentes se resolvieron en su mayor parte, pero se recombinaron como una mezcla de compuestos **102a/b** para transformaciones adicionales (967 mg, rendimiento del 57 %).

Una mezcla de compuestos **102a/b** (917 mg, 3,29 mmol) se llevó a una mezcla de compuestos **106a/b** siguiendo los procedimientos del Ejemplo 3, haciendo los cambios necesarios:

**103a/b**: (1,39 g, rendimiento del 67 %). CLEM M+H = 630,20 (2 picos con la misma masa).

**104a/b**: (0,52 g, rendimiento del 62 %). CLEM M+H = 600,20 (2 picos con la misma masa).

**105a/b**: (0,50 g, rendimiento del 84 %). CLEM M+H = 684,75 (2 picos con la misma masa).

**106a**: (158 mg, rendimiento del 38 %) CLEM M+H = 570,25 (después de la separación de **106b** mediante cromatografía en gel de sílice, gradiente de EtOAc al 50-100 %/hexanos).

**106b**: (179 mg, rendimiento del 43 %) CLEM M+H = 570,30 (después de la separación).

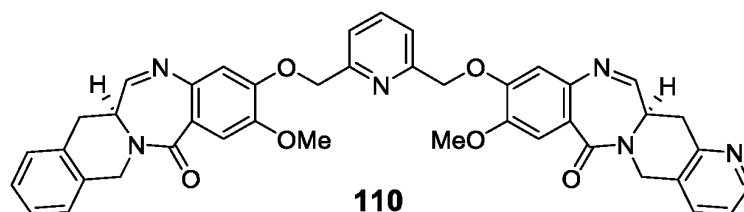
### Ejemplo 25 - Dímero Ila-16

Este ejemplo y la Fig. 22 se refieren a la preparación del dímero **Ila-16**, que tiene nitrógeno en uno de los anillos de benceno externos, es decir, un G o G' en la fórmula (I) es N.

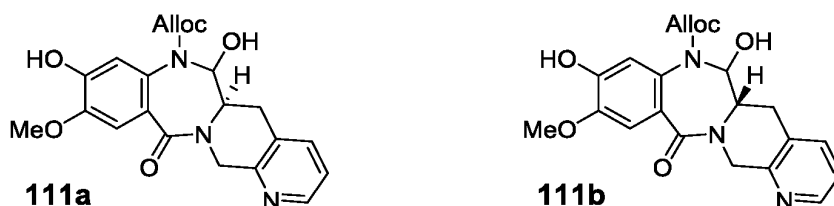
Se convirtió compuesto **106b** en una mezcla de enantiómeros **108a** y **108b** siguiendo los procedimientos del Ejemplo 3, haciendo los cambios necesarios, que se separaron mediante cromatografía CET quiral en una columna CHIRALPAK® IE eluyendo con MeOH al 20 % en CO<sub>2</sub>. **108a**: CLEM M+H = 411,95; 25 mg, rendimiento del 23 %). **108b**: CLEM M+H = 411,95; 22 mg, rendimiento del 20 %.

El enantiómero **108b** se acopló con el compuesto **36** de forma análoga siguiendo el procedimiento del Ejemplo 6 para proporcionar compuesto de bis-Aloc **109**, que después se trató con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> para producir el dímero **Ila-16** (4,3 mg, rendimiento del 45 %). CLEM M+H = 721,30.

De forma análoga, se convirtió enantiómero **108a** en dímero **110**, que tiene la estereoquímica antinatural en una de las unidades diméricas:



También de forma análoga, se convirtió compuesto **106a** en los enantiómeros **111a** (CLEM M+H = 411,95; 18,6 mg, rendimiento del 18 %) y **111b** (CLEM M+H = 411,95; 19 mg, rendimiento del 18 %). Estos enantiómeros pueden usarse para preparar dímeros según los procedimientos anteriores, haciendo los cambios necesarios.



### Ejemplo 26 - Actividad biológica de los dímeros

La actividad citotóxica de los dímeros de la presente invención puede someterse a ensayo frente a diversas estirpes celulares de cáncer, tales como estirpes celulares de cáncer de pulmón H226, cáncer de pulmón DMS 79, cáncer de pulmón H187, cáncer gástrico N87, cáncer renal 786-O y/o cáncer de ovario OVCAR3. La capacidad de los dímeros para inhibir la proliferación celular puede medirse mediante un ensayo de luminiscencia ATP o un ensayo de proliferación celular MTS. Generalmente, estos dos métodos producen resultados comparables.

Este es un procedimiento general para un ensayo de luminiscencia ATP: Se siembran células a 1 x 10<sup>3</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 h para ensayos ATP CellTiterGlo™, respectivamente. Se añaden diluciones en serie (1:3) de compuestos a los pocillos. Las placas se dejan incubar durante 72 h. Se usa un kit de viabilidad celular CellTiterGlo™ de Promega para medir el contenido de ATP de las células tratadas con compuestos de ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. Una disminución en el contenido de ATP es una medida de

disminución en la viabilidad celular. El valor de CE<sub>50</sub>, la concentración a la que un agente reduce la viabilidad celular en un 50 % del efecto máximo, puede calcularse usando el software PRISM™, versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

- 5 El ensayo de proliferación celular MTS se realizó de la siguiente manera: Se usa el kit de proliferación celular acuoso no radiactivo CellTiter 96 de Promega (Madison, WI) para determinar el número de células viables en el ensayo de proliferación celular. Las células tumorales se siembran en placas a determinadas densidades de siembra en placas Matrix de fondo transparente de color negro estériles de 384 pocillos a 40 µl por pocillo y se incuban durante la noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % antes del ensayo. Al día siguiente, se usa un conjunto de placas celulares (10 placas)
- 10 para determinar la densidad celular a tiempo cero y se añade 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio a 4 µl/pocillo en 10 placas seguido de incubación a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres horas. Este reactivo de tetrazolio es biorreducido por las células hepáticas para formar un producto de formazán que es soluble en solución acuosa. La absorbancia a 490 nm se mide en un lector Envision (Perkin Elmer, Boston, MA). El mismo día, se añaden los compuestos a las placas celulares restantes (placas T72) y se incuban a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %.
- 15 Después de 72 horas, se añaden 4 µl de reactivos MTS en esas placas celulares. Las placas se incuban adicionalmente a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres horas y los valores de absorbancia a A490 se midieron en un lector Envision.

Los resultados se presentan en la Tabla I:

20

Dímero	Estirpe celular de cáncer: CI <sub>50</sub> (nM)		
	DMS 79	H187	N87
Ila-01	0,001	0,001	0,02
Ila-02	-	-	0,03
Ila-03	0,002	0,002	0,03
Ila-04	-	-	0,04
Ila-05	-	-	0,1
Ila-06	-	-	0,14
Ila-07	-	-	0,25
Ila-08	-	-	2,71
Ila-09	-	-	4,7
Ila-10	-	-	0,07
Ila-11	-	-	4,92
Ila-12	-	-	0,11
Ila-13	-	-	0,03
Ila-14	-	-	0,05
Ila-15	-	-	2,88
Ila-16	-	-	0,08
100	-	-	0,1

### Ejemplo 27 - Actividad biológica de los conjugados

- 25 Los compuestos dímero-enlazador se conjugaron con un anticuerpo anti-fucosil GM1 siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente en el presente documento. Se realizaron ensayos frente a estirpes celulares de cáncer gástrico N87, cáncer de pulmón microcítico DMS 79 y/o H187, expresando la primera mesotelina y expresando las dos últimas fucos87il GM1 en sus superficies celulares. La actividad se midió usando un ensayo de <sup>3</sup>H timidina (Cong *et al.* 2014). Los resultados se presentan en la Tabla II.

Conjugado			Estirpe celular cancerosa - CI <sub>50</sub> (nM)		
Anticuerpo	Dímero-enlazador	DAR	DM 79	H187	N87
Anti-fucosil GM1	IIIb-01	~ 2	0,3	0,5	
Anti-fucosil GM1	IIIb-02	~ 2	2,1	1,8	
Anti-fucosil GM1	IIIc-01	~ 2	0,4	0,4	
Anti-mesotelina	IIIb-01	-	-	-	0,01
Anti-mesotelina	IIIb-02	-	-	-	0,12
Anti-mesotelina	IIIc-01	-	-	-	0,01
Anti-mesotelina	IIIc-02	-	-	-	0,03

En una realización preferida, en un conjugado de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-fucosil GM1 o un anticuerpo anti-mesotelina.

- 5 La descripción detallada anterior de la invención incluye pasajes que se refieren principalmente o exclusivamente a partes o aspectos particulares de la invención. Ha de comprenderse que esto es por claridad y conveniencia, que una característica particular puede ser pertinente en más pasajes que en el que se describe y que la divulgación del presente documento incluye todas las combinaciones apropiadas de información encontradas en los diferentes pasajes. De manera similar, aunque las diversas figuras y descripciones en el presente documento se refieren a realizaciones específicas de la invención, ha de comprenderse que cuando se desvela una característica específica en el contexto de una figura o realización particular, dicha característica también puede usarse, en la medida adecuada, en el contexto de otra figura o realización, en combinación con otra característica, o en la invención en general.
- 10
- 15 Adicionalmente, aunque la presente invención se ha descrito en particular en términos de determinadas realizaciones preferidas, la invención no se limita a dichas realizaciones preferidas. Más bien, el alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

## Referencias

- 20 A continuación se proporcionan citas completas de las siguientes referencias citadas de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anteriormente en la presente memoria descriptiva.

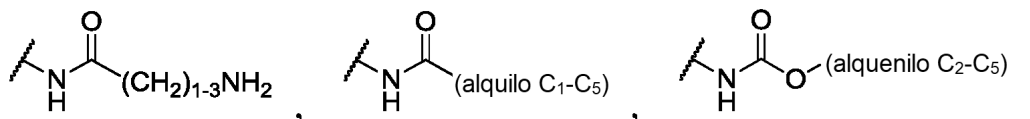
- 25 Antonow et al., *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2927.  
 Beau-Larvor et al., documento WO 2014/174111 A1 (2014).  
 Bose et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114 (12), 4939.  
 Bouchard et al., documento US 8.404.678 B2 (2013).  
 Chari et al., documento WO 2013/177481 A1 (2013).  
 Commercon et al., documento US 8.481.042 B2 (2013) [2013a].  
 30 Commercon et al., documento US 2013/0137659 A1 (2013) [2013b].  
 Fishkin et al., documento WO 2012/112687 A1 (2012).  
 Fishkin et al., documento US 8.765.740 B2 (2014).  
 Flygare et al., documento US 2013/0266595 A1 (2013).  
 Gauzy et al., documento US 8.163.736 B2 (2012).  
 35 Gregson et al., *Chem. Comm.* 1999 (9), 797.  
 Gregson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 2859 [2001a].  
 Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 737 [2001b].  
 Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1161.  
 Gregson et al., documento US 7.612.062 B2 (2009).  
 40 Hartley, *Exp. Opin. Investigational Drugs* 2011, 20 (6), 733.  
 Hartley et al., *Investigational New Drugs* 2012, 30, 950.  
 Howard, documento US 2014/0120118 A1 (2014) [2014a].  
 Howard, documento US 2014/0127239 A1 (2014) [2014b].  
 Howard, documento WO 2014/096365 A1 (2014) [2014c].  
 45 Howard, documento WO 2014/096368 A1 (2014) [2014d].  
 Howard, documento WO 2014/140174 A1 (2014) [2014e].  
 Howard et al., documento US 2007/0191349 A1 (2007).  
 Howard et al., documento US 7.528.126 B2 (2009) [2009a].  
 Howard et al., documento US 7.557.099 B2 (2009) [2009b].  
 50 Howard et al., documento US 7.741.319 B2 (2010).  
 Howard et al., documento US 2011/0256157 A1 (2011).  
 Howard et al., documento US 8.501.934 B2 (2013) [2013a].  
 Howard et al., documento US 8.592.576 B2 (2013) [2013b].  
 Howard et al., documento US 2013/0028919 A1 (2013) [2013c].  
 55 Howard et al., documento WO 2013/041606 A1 (2013) [2013e].  
 Howard et al., documento US 8.697.688 B2 (2014) [2014a].  
 Howard et al., documento US 2014/0120118 A1 (2014).  
 Howard et al., documento US 2014/0234346 A1 (2014) [2014b].  
 Howard et al., documento US 2014/0274907 A1 (2014) [2014c].  
 60 Howard et al., documento US 2014/0294868 A1 (2014).  
 Howard et al., documento WO 2014/096368 A1 (2014).  
 Howard et al., documento WO 2014/140174 A1 (2014).  
 Howard et al., documento WO 2014/140862 A2 (2014) [2014d].  
 Jeffrey et al., *Bioconj. Chem.* 2013, 24, 1256.  
 65 Jeffrey et al., documento US 2014/0286970 A1 (2014) [2014a].  
 Jeffrey et al., documento US 2014/0302066 A1 (2014) [2014b].

- Kothakonda et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4371.  
Li et al., documento US 8.426.402 B2 (2013).  
Li et al., documento WO 2014/031566 A1 (2014).  
Liu et al., documento US 7.244.724 B2 (2007).  
5 Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.  
Senter et al., documento US 7.659.241 B2 (2010).  
Thurston et al., *J. Org. Chem.* 1996, 61 (23), 8141.  
Thurston et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1951.  
Thurston et al., documento US 7.049.311 B1 (2006).  
10 Thurston et al., documento US 7.407.951 B1 (2008).  
Zhao et al., documento WO 2014/080251 A1 (2014).

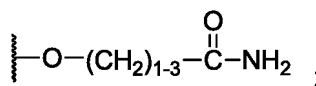




sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  u  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ ,



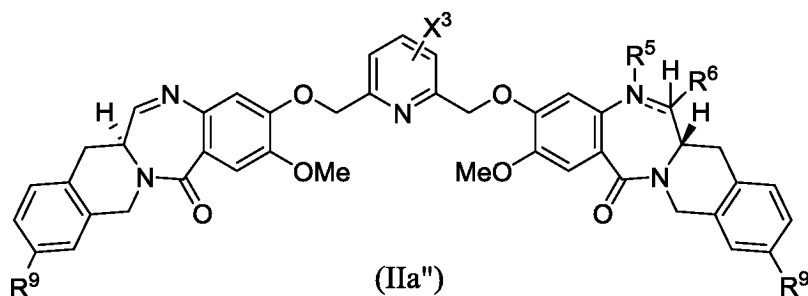
5 o



10 o donde un  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$  o  $\text{R}^{10}$  están unidos a un G o G' que es N, tal como  $\text{R}^7$ ,  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^9$  o  $\text{R}^{10}$  está ausente;  
 las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>; R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;  
 15 R<sup>11</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;  
 cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHNH<sub>2</sub> o C(=O)NHNH<sub>2</sub>; cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y  
 20 Y' e Y "son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y";

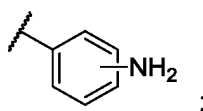
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 2. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIa")



30 en la que

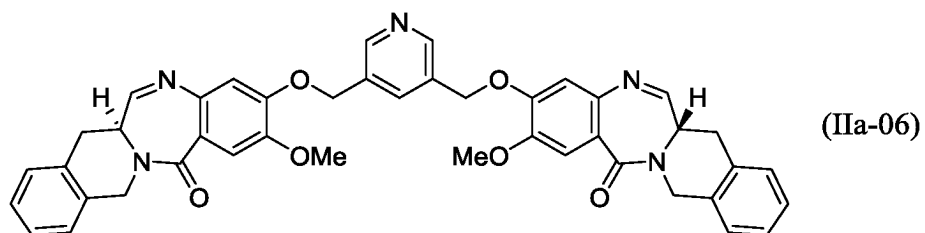
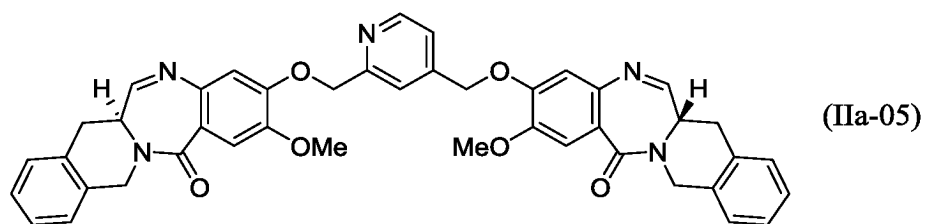
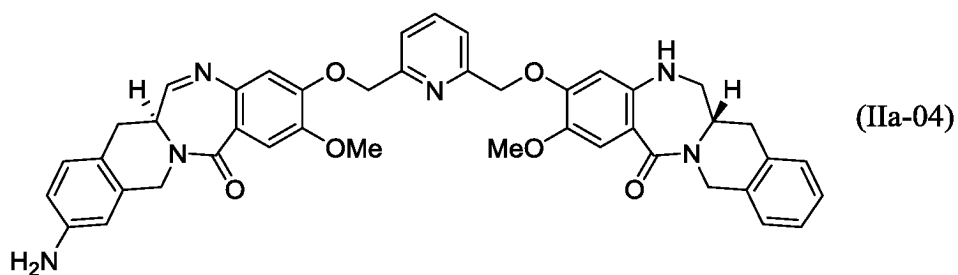
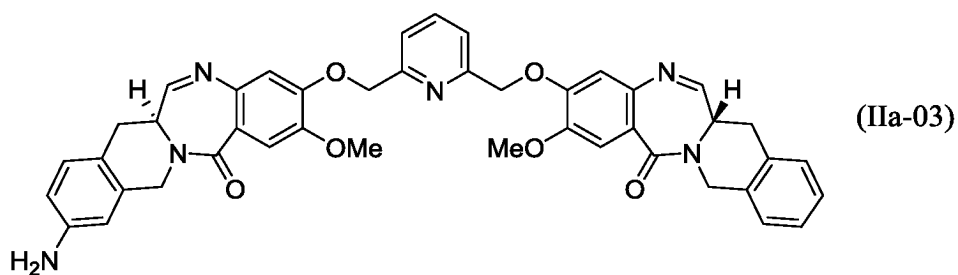
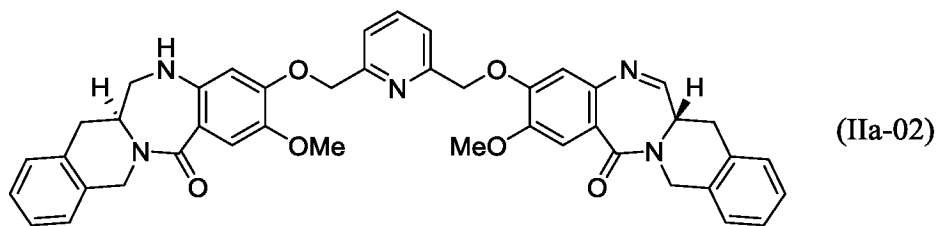
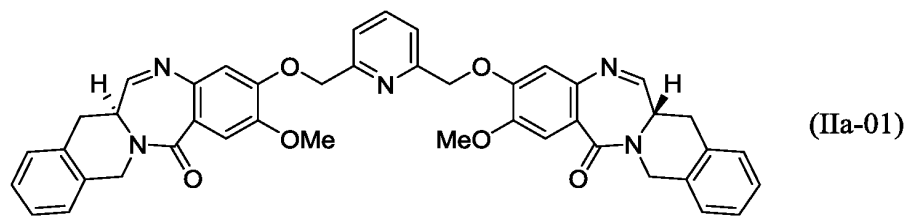
R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;  
 35 R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;  
 cada R<sup>9</sup> es independientemente H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o

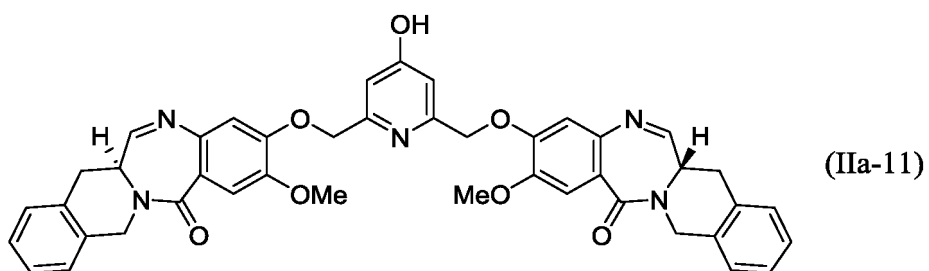
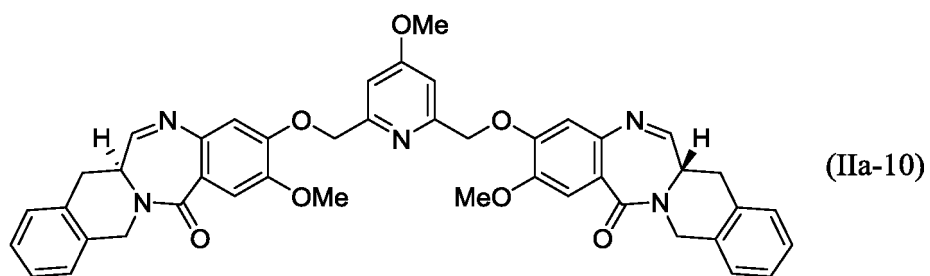
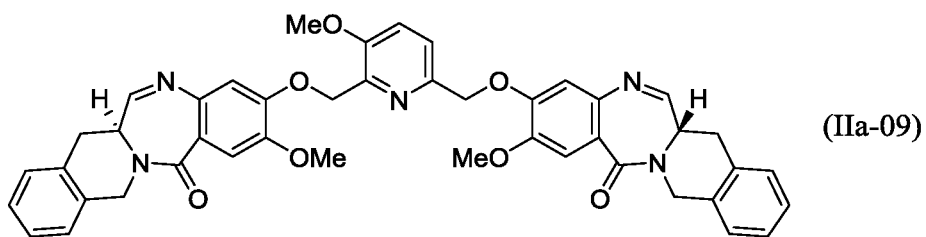
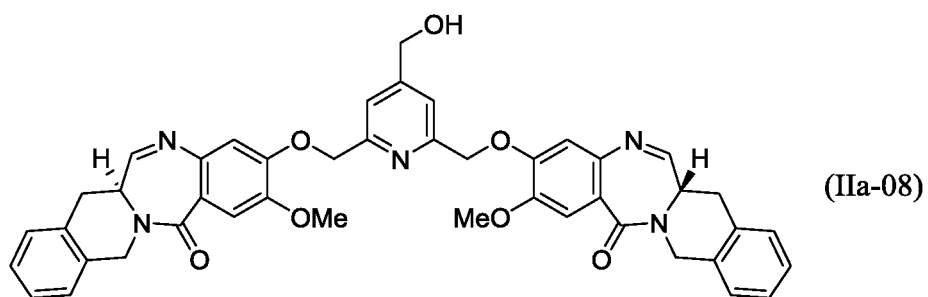
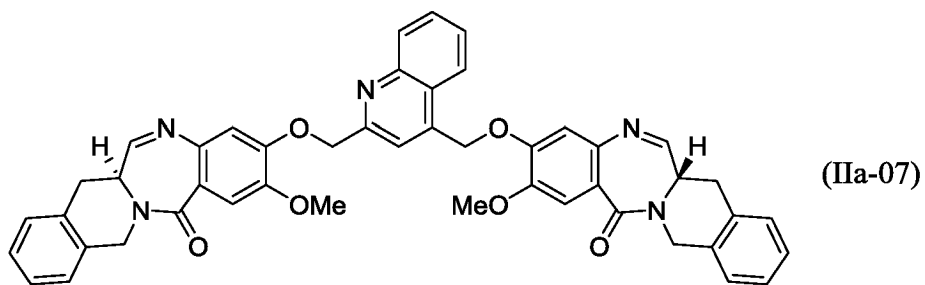


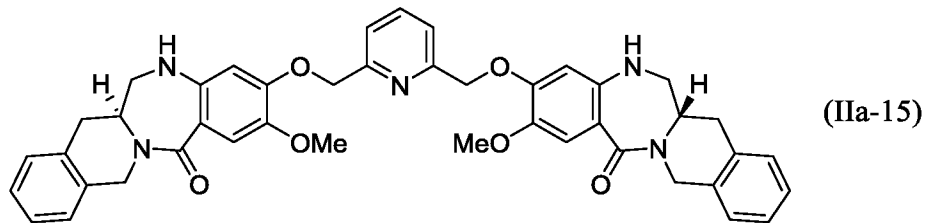
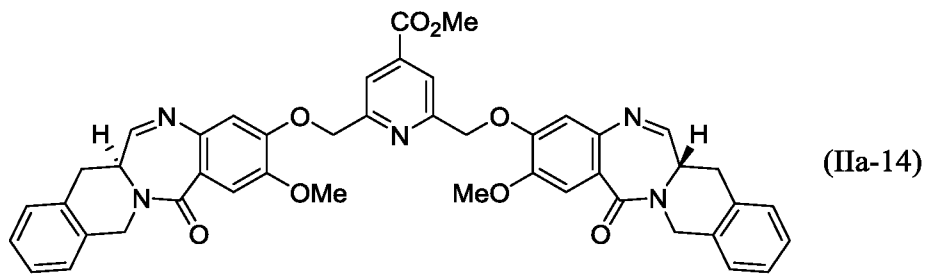
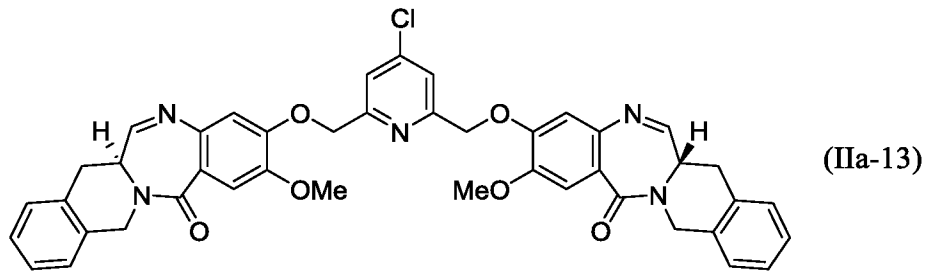
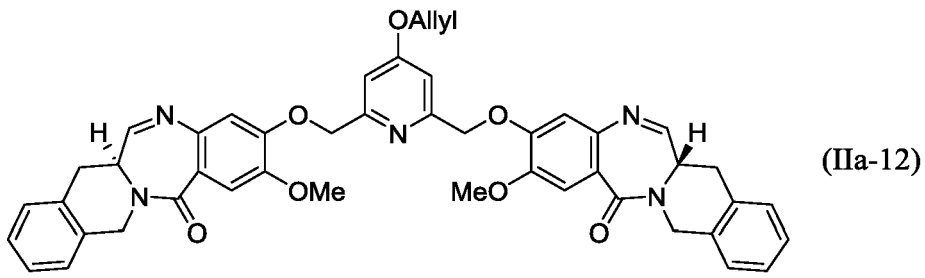
40 y  
 X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me, CH<sub>2</sub>OH, O(alilo), Cl o CO<sub>2</sub>Me;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

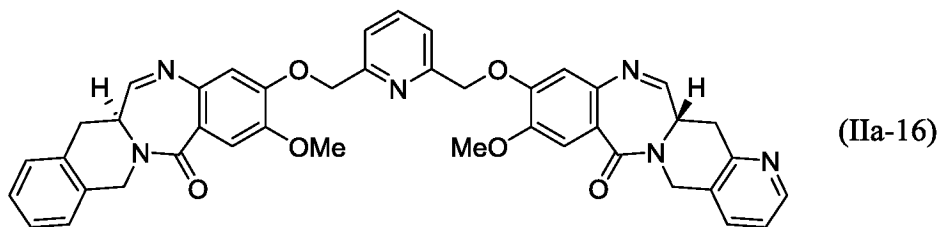
45 3. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 2, seleccionado entre el grupo que consiste en





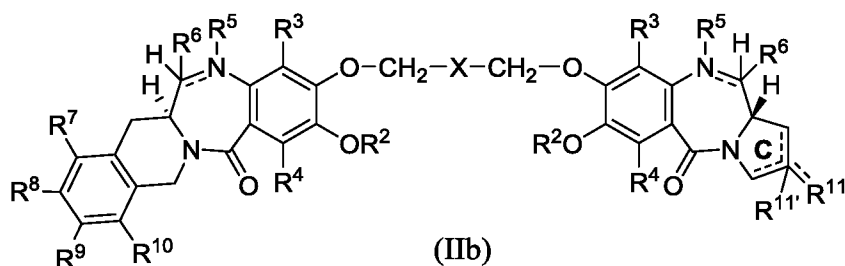


y



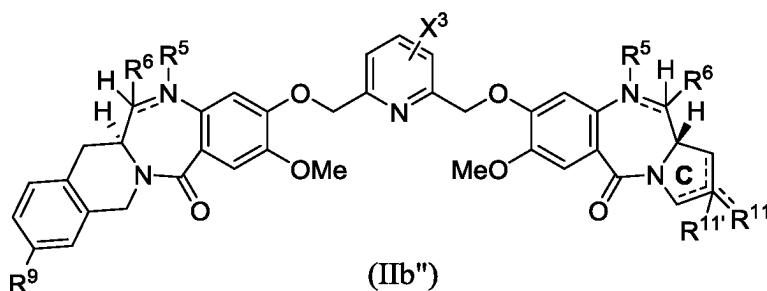
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIb)



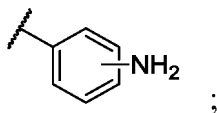
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIb'')



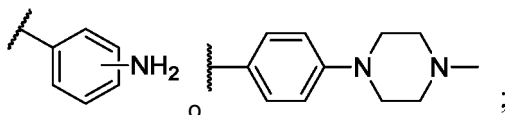
10 en la que

R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o



15

R<sup>11</sup> es H, =CH<sub>2</sub>, CH=CHMe, =CHMe, C≡CCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,



20

R<sup>11'</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;

X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me, CH<sub>2</sub>OH, O(alilo), Cl o CO<sub>2</sub>Me;

al menos una de las líneas dobles en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;

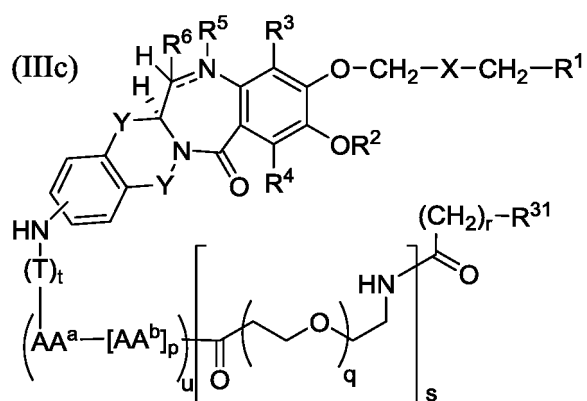
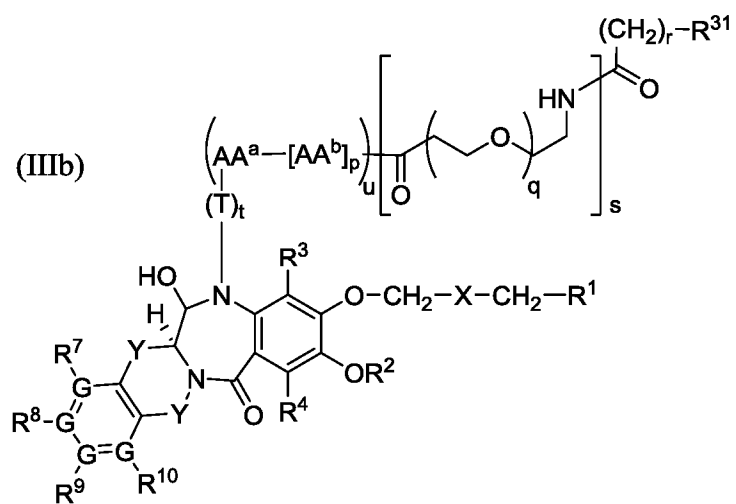
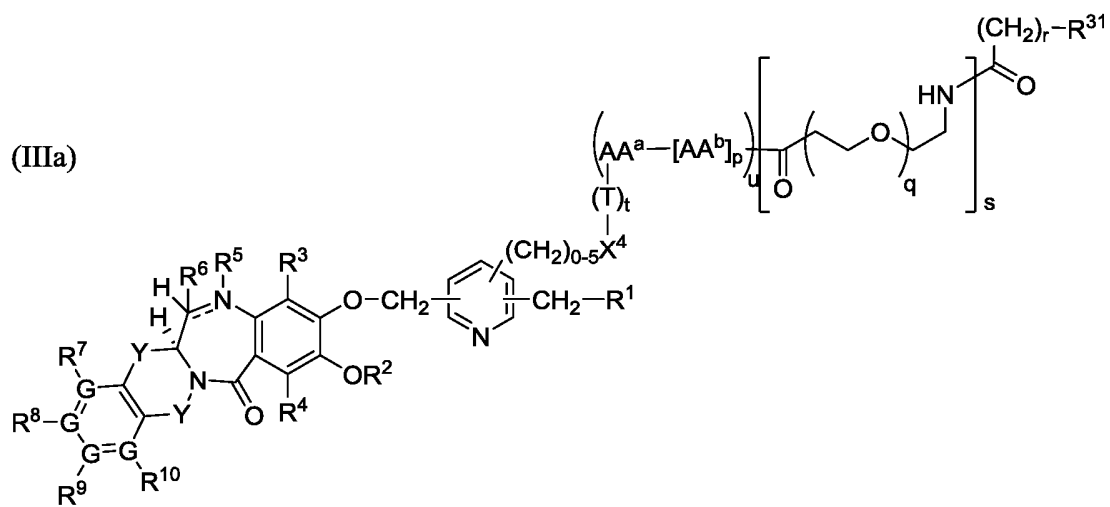
R<sup>5</sup> es H si la línea doble al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace; y

25

R<sup>6</sup> es H si la línea doble al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble es un doble enlace;

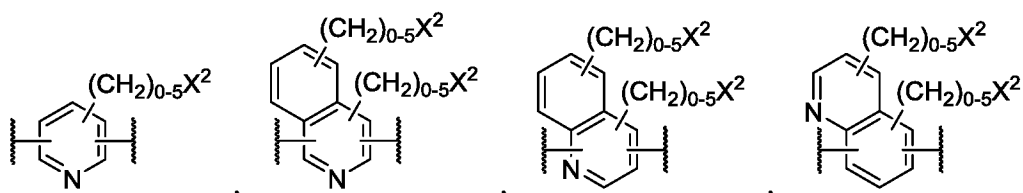
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina que tiene una estructura representada por las fórmulas (IIIa), (IIIb), (IIIc) o (IIIc'')

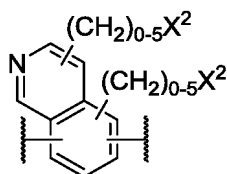








y



5

cada G y G' es C o N, con la condición de que no más de dos G o dos G' sean N; cada R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), ciano, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>NH<sub>2</sub> o NO<sub>2</sub>;

10 cada línea doble  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

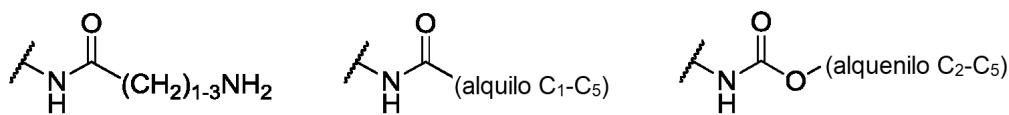
cada R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

15

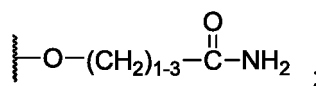
cada R<sup>6</sup> es H, OH, SO<sub>3</sub>Na o SO<sub>3</sub>K si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

20



o



25

o donde un R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está unido a un G o G' que es N, tal como R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está ausente;

las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>;

30

R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

35

R<sup>11'</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;

cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHHNH<sub>2</sub> o C(=O)NHHNH<sub>2</sub>; X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;

40

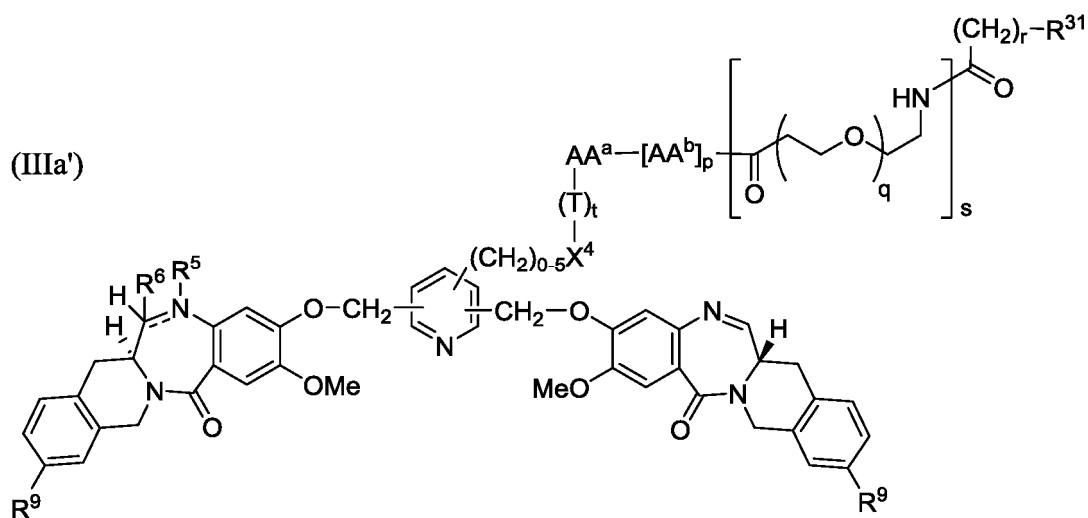
cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN;

cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y

Y' e Y "son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y";

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIa')

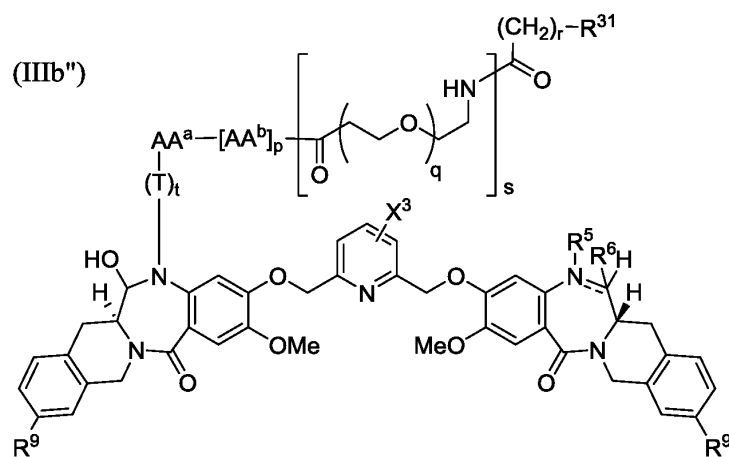


5 en la que

10 cada  $R^9$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_3$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-4}H$ ,  $(CH_2CH_2O)_{1-4}$ (alquilo  $C_1-C_3$ ), OH, Cl, F o Br;  
 $R^5$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y  
 $R^6$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIb'')



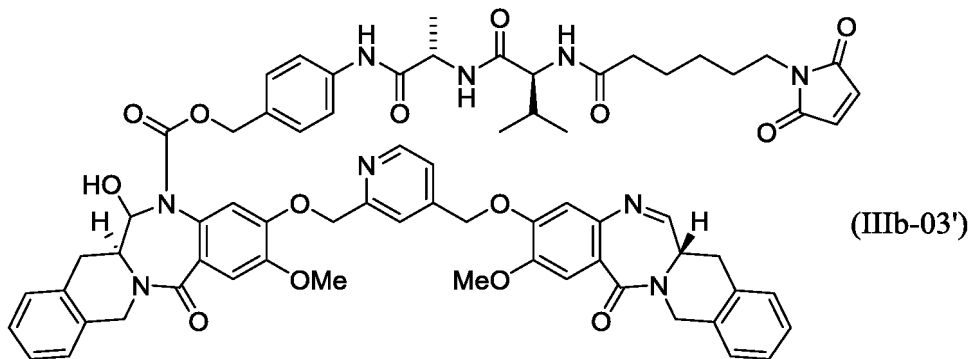
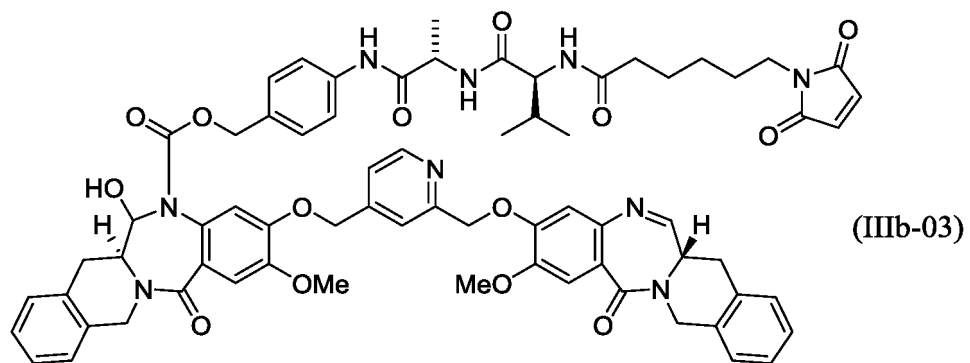
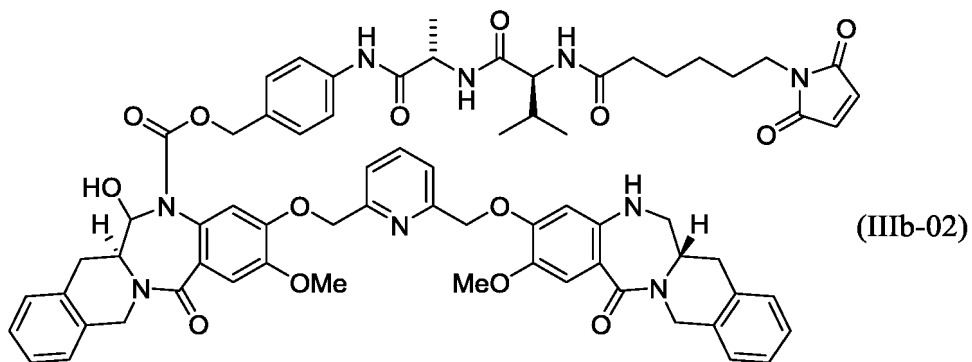
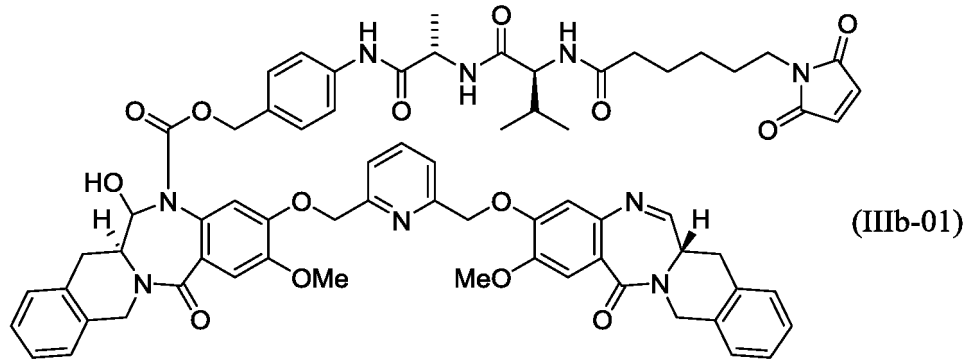
20 en la que

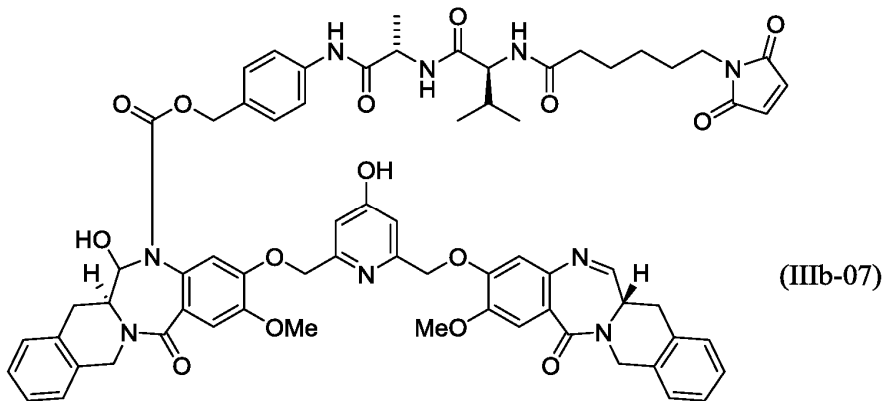
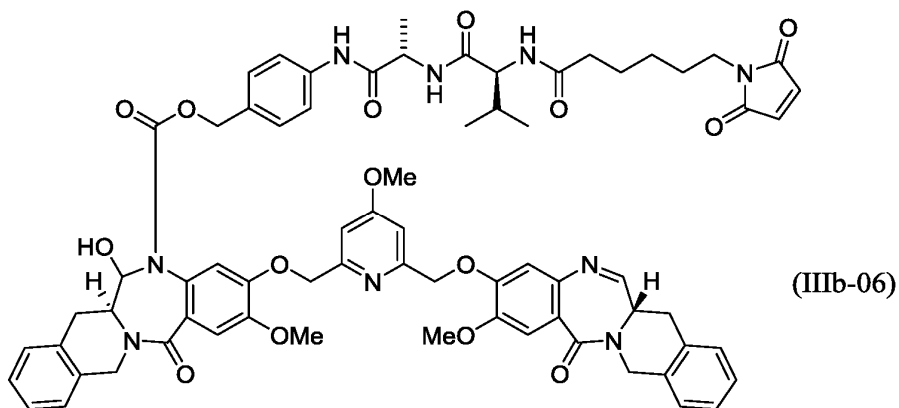
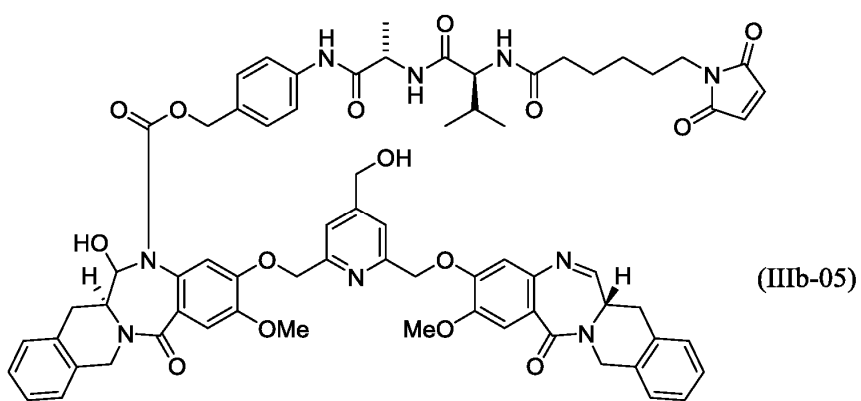
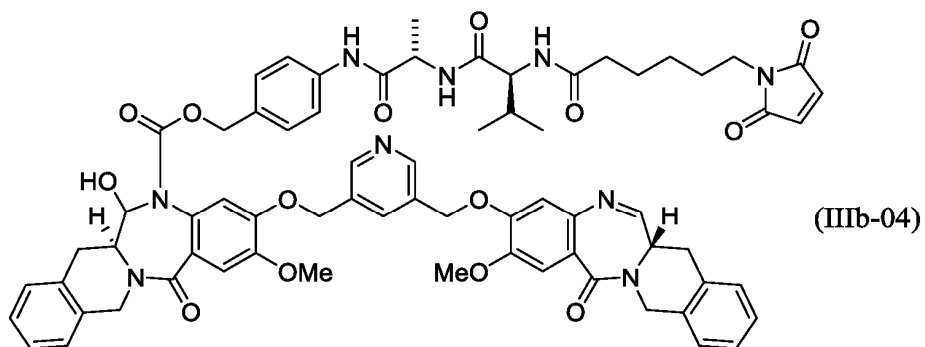
25 cada  $R^9$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_3$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-4}H$ ,  $(CH_2CH_2O)_{1-4}$ (alquilo  $C_1-C_3$ ), OH, Cl, F o Br;  
 $X^3$  es H, OH, OMe, Me,  $CH_2OH$ , O(alilo), Cl o  $CO_2Me$ ;  
 $R^5$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y  
 $R^6$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

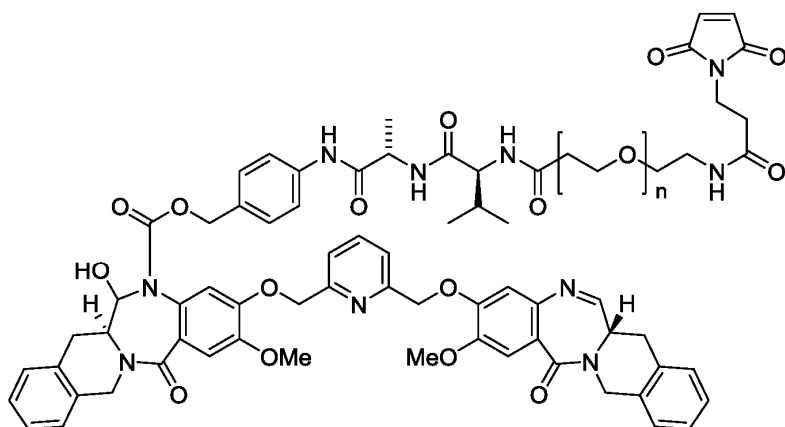
30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 8, seleccionado entre el grupo que

consiste en

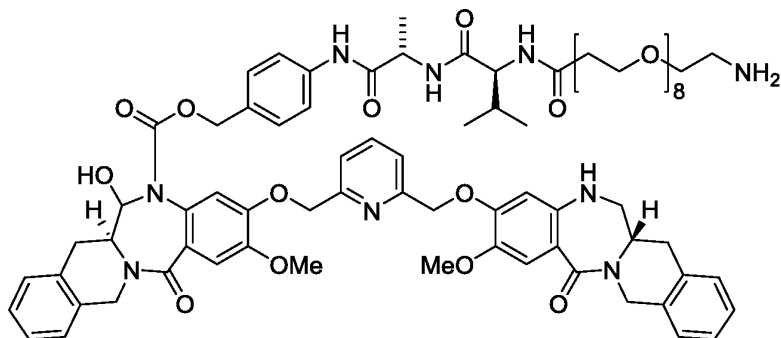






IIIb-08 n = 8    IIIb-08a n = 6  
 IIIb-08b n = 4    IIIb-08c n = 2

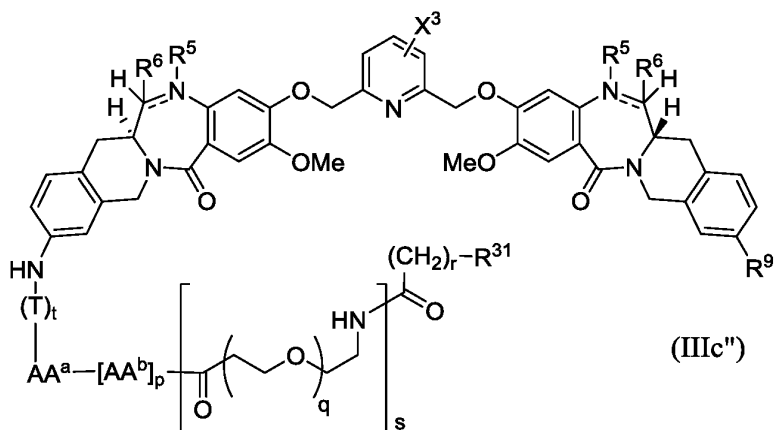
5 y



(IIIb-09)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 10. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por fórmula (IIIc'')





(IIIc'')

15 en la que

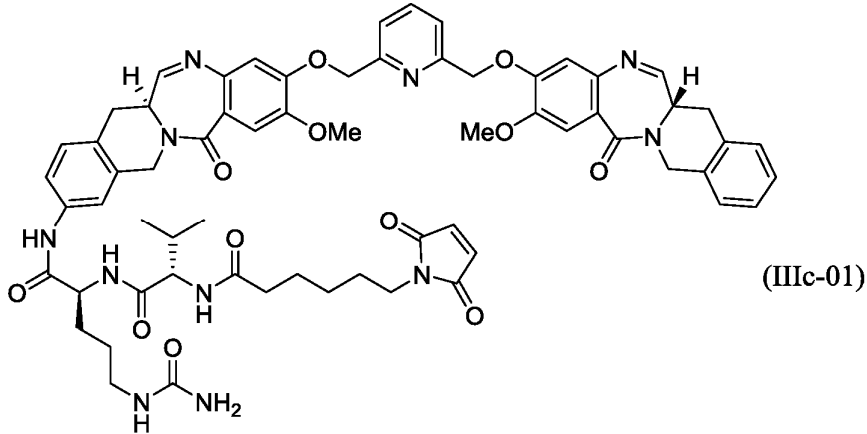
$X^3$  es H, OH, OMe, Me,  $CH_2OH$ , O(alilo), Cl o  $CO_2Me$ ;

al menos una de las líneas dobles  $\text{-----}$  en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;

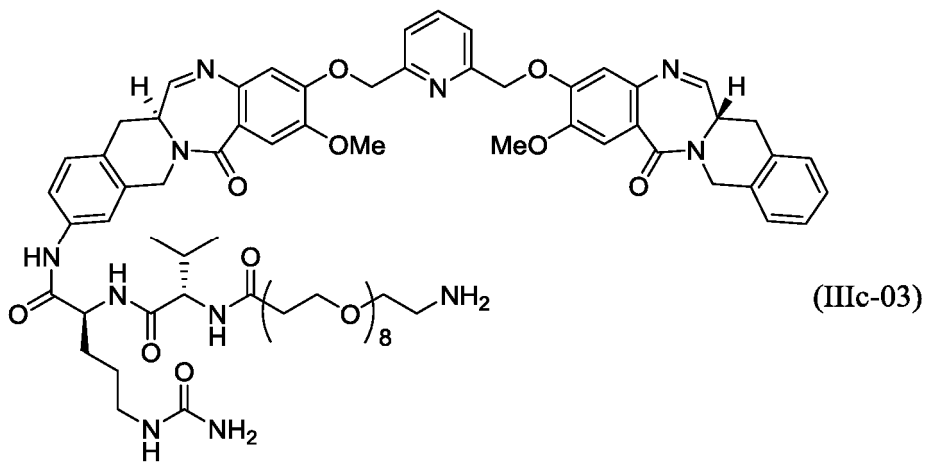
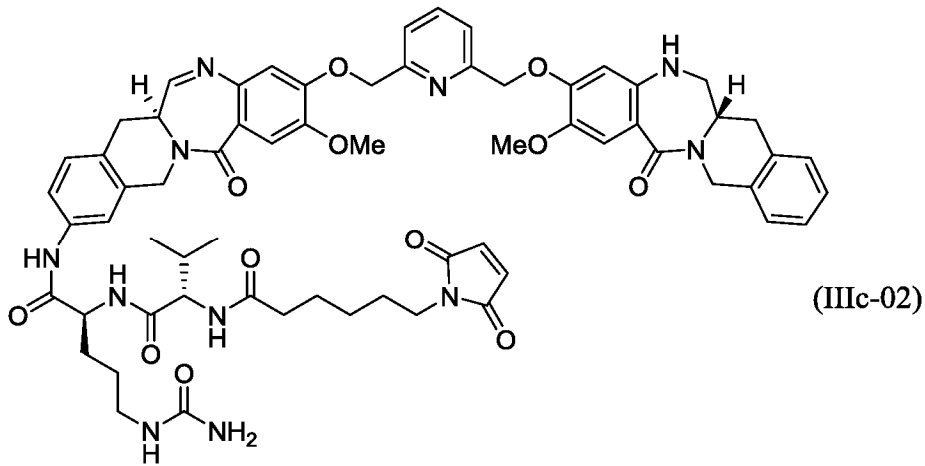
20  $R^5$  es H si la línea doble  $\text{-----}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{-----}$  es un doble enlace;

R<sup>6</sup> es H si la línea doble  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  es un doble enlace; y  
 R<sup>9</sup> es H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), OH, Cl, F o Br; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

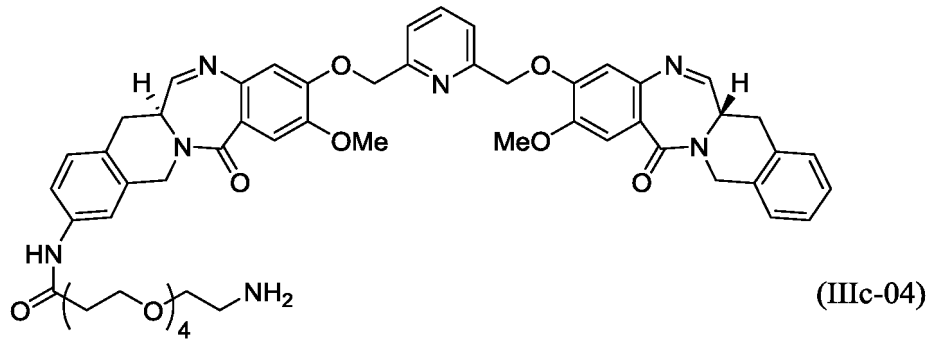
5 11. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 10, seleccionado entre el grupo que consiste en



10

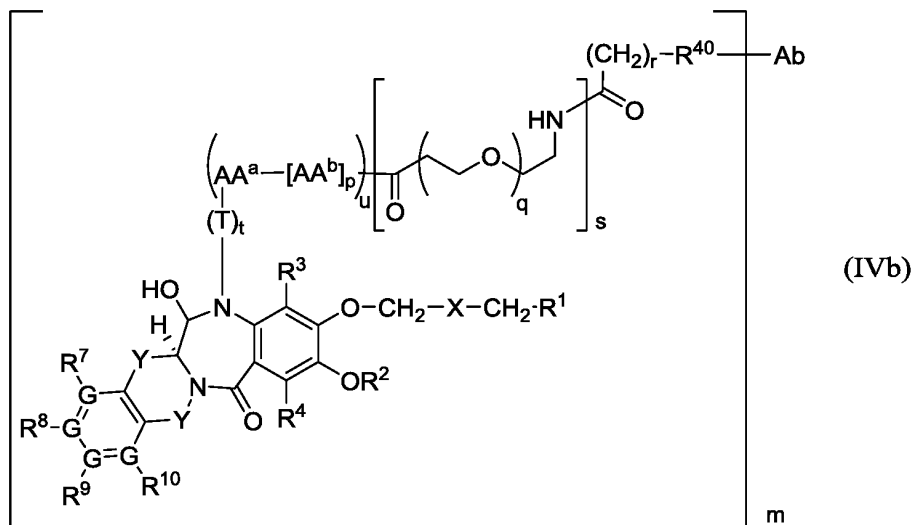
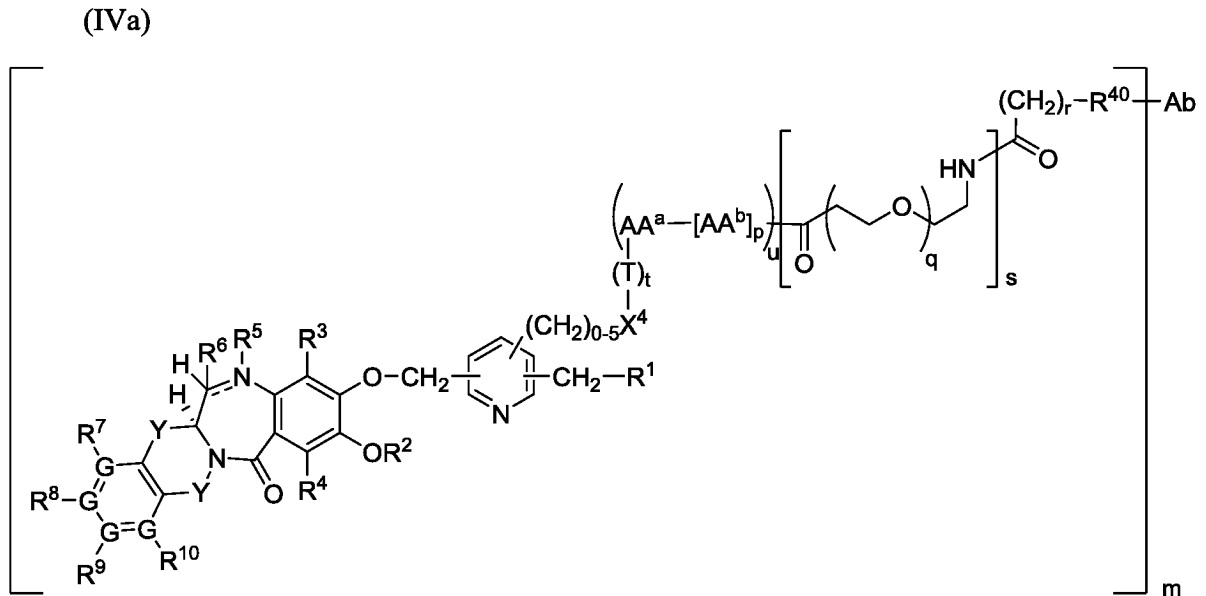


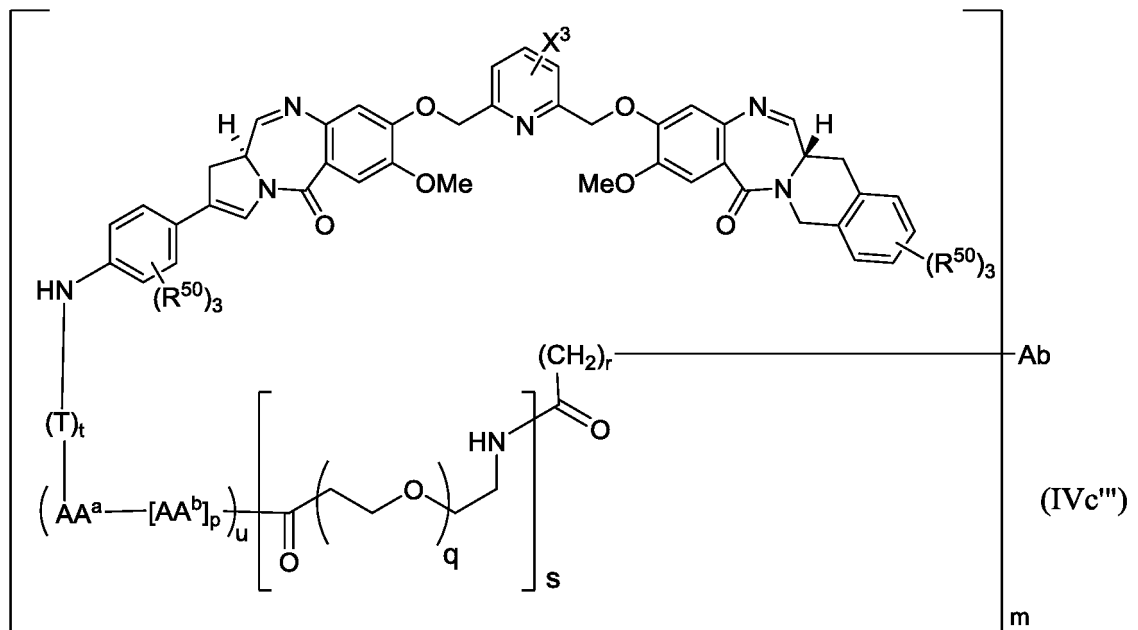
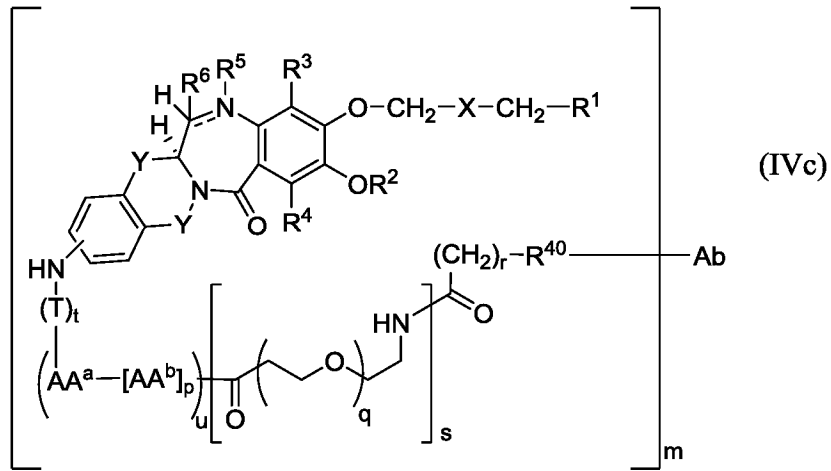
15 y



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

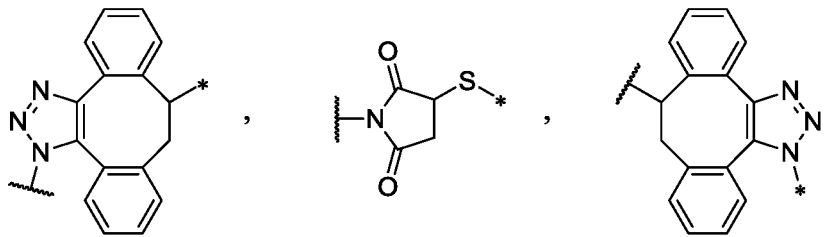
- 5 12. Un conjugado de un dímero de benzodiazepina y un anticuerpo, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVa), (IVb), (IVc) o (IVc'')



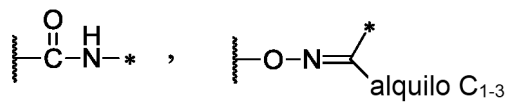


5 en las que

Ab es un anticuerpo;  
R<sup>40</sup> es

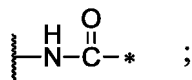


10

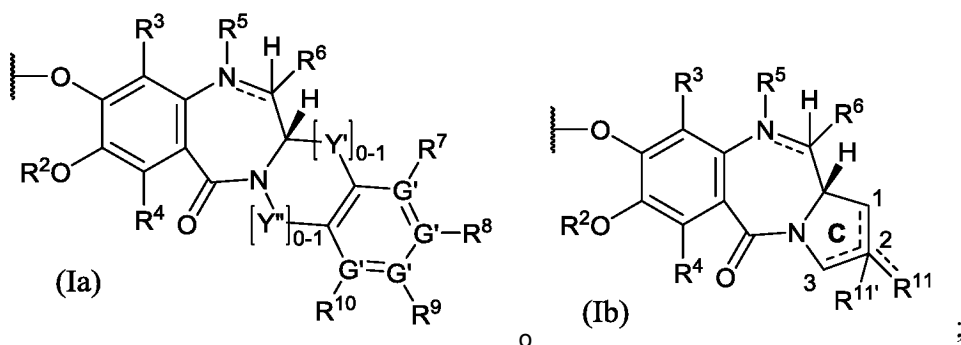




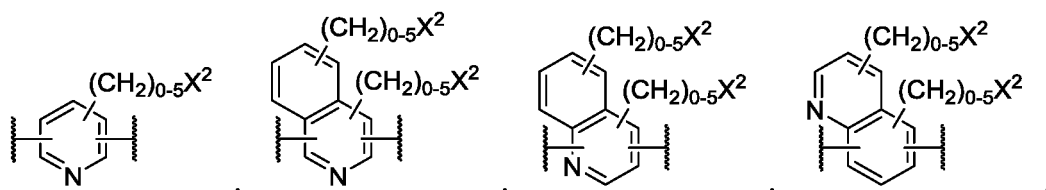
o



- 5 donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida al Ab se indica con un asterisco (\*) y la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida a (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> se indica con una línea ondulada (~~~~~);  
 m es 1, 2, 3 o 4;  
 T es un grupo autoinmolante;  
 t es 0 o 1;
- 10 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
 u es 0 o 1;  
 p es 1, 2, 3 o 4;  
 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);  
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 s es 0 o 1;  
 X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me o CH<sub>2</sub>OH;  
 X<sup>4</sup> es S-S, O o NH;
- 20 R<sup>1</sup> es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):

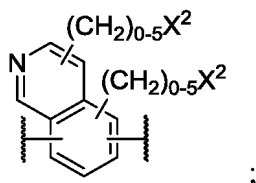


- 25 X se selecciona entre el grupo que consiste en



30

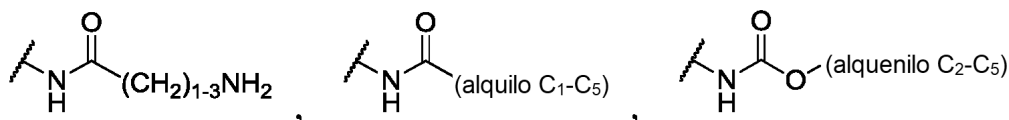
y



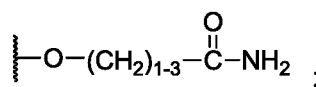
- 35 cada G y G' es C o N, con la condición de que no más de dos G o dos G' sean N;  
 cada R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;  
 cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), ciano, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>NH<sub>2</sub> o NO<sub>2</sub>;  
 cada línea doble  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;  
 cada R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada R<sup>6</sup> es H, OH, SO<sub>3</sub>Na o SO<sub>3</sub>K si la línea doble  $\overline{\text{---}}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\overline{\text{---}}$  es un doble enlace;

cada R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>,



10 o



o donde un R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está unido a un G o G' que es N, tal como R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está ausente;

las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>; R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

R<sup>11</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;

cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN;

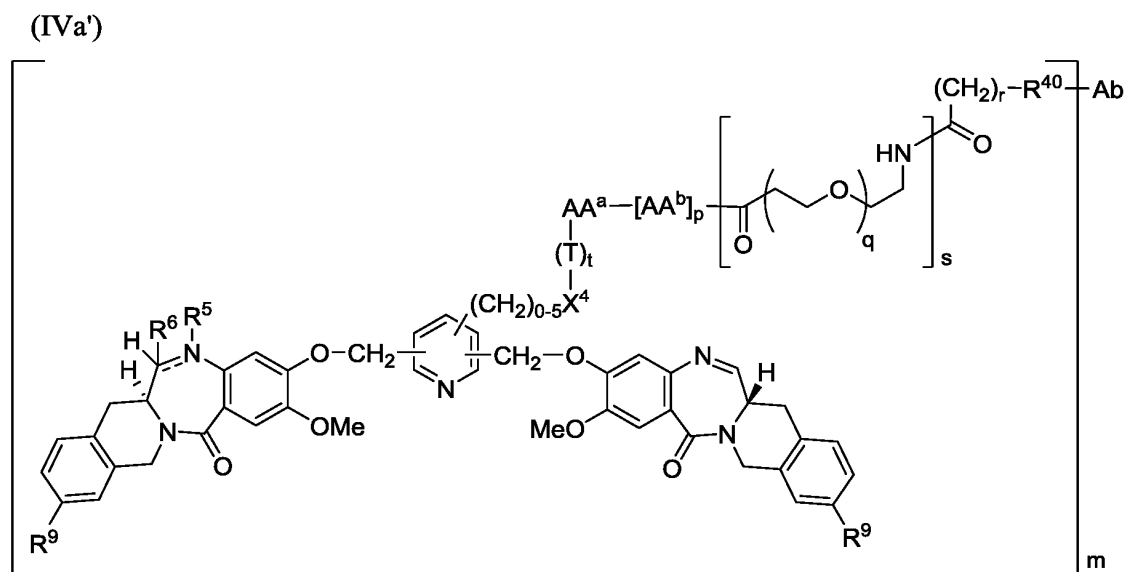
cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHNH<sub>2</sub> o C(=O)NHNH<sub>2</sub>;

cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y

Y' e Y "son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en la que cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y";

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Un conjugado de un dímero de benzodiazepina y un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVa')

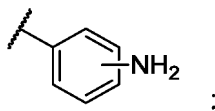


en la que

R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

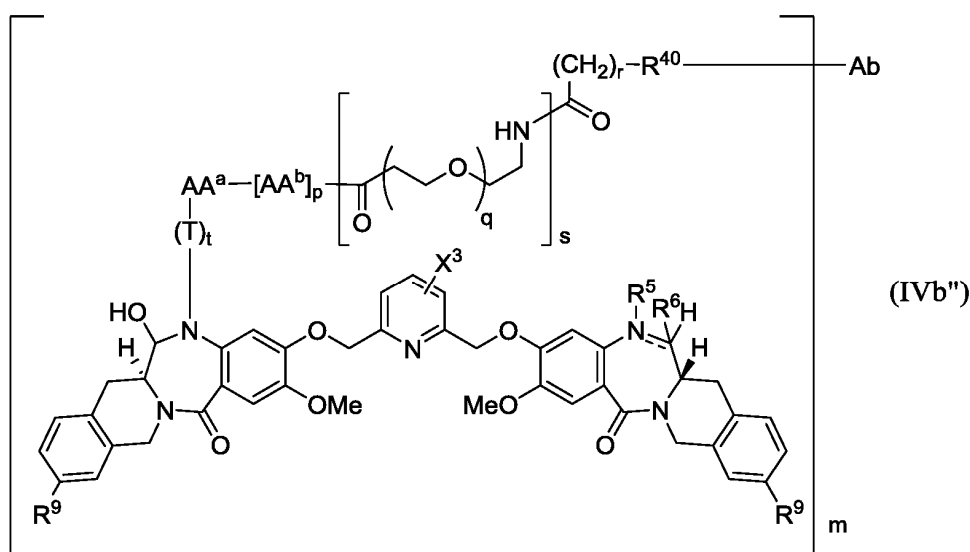
R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

5 R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, F, Cl, Br o



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 14. Un conjugado de un dímero de benzodiazepina y un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVb'')



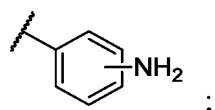
15 en la que

X<sup>3</sup> es H, OH, OMe, Me CH<sub>2</sub>OH, O(alilo), Cl o CO<sub>2</sub>Me;

20 R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

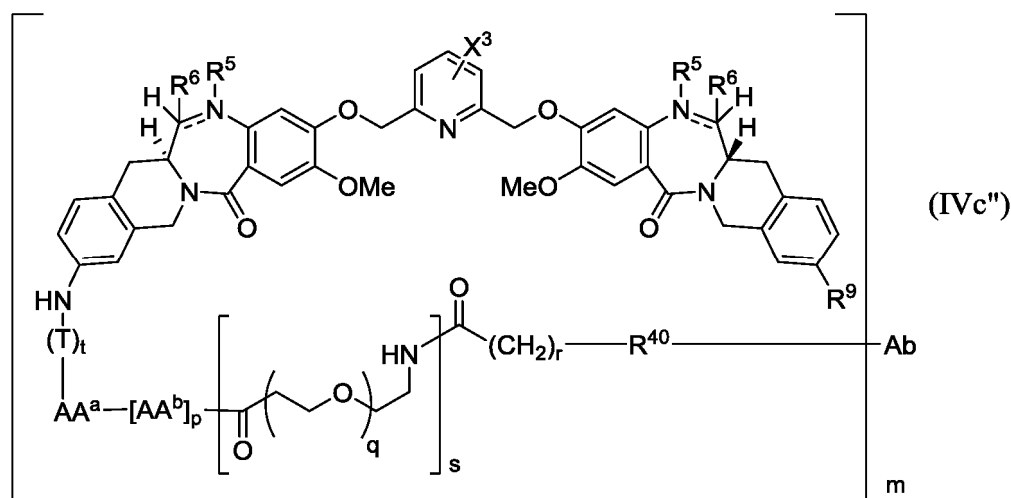
R<sup>6</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace; y

R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, F, Br, Cl o



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 15. Un conjugado de un dímero de benzodiazepina y un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVc'')

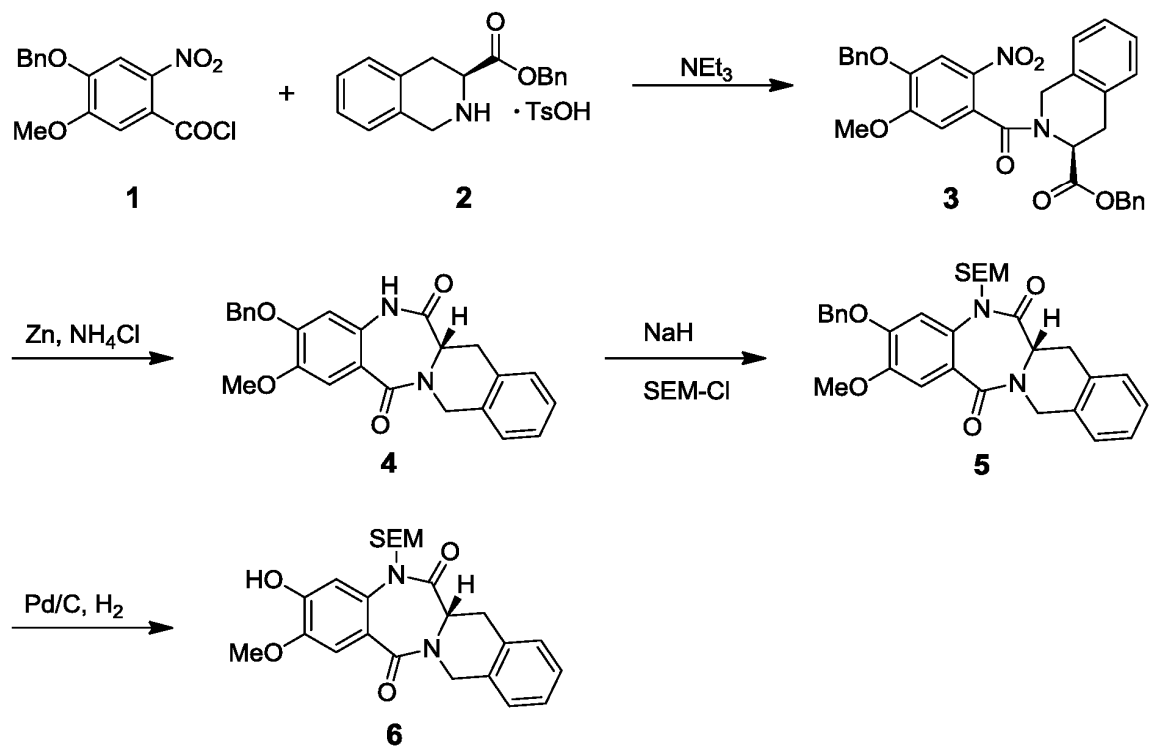


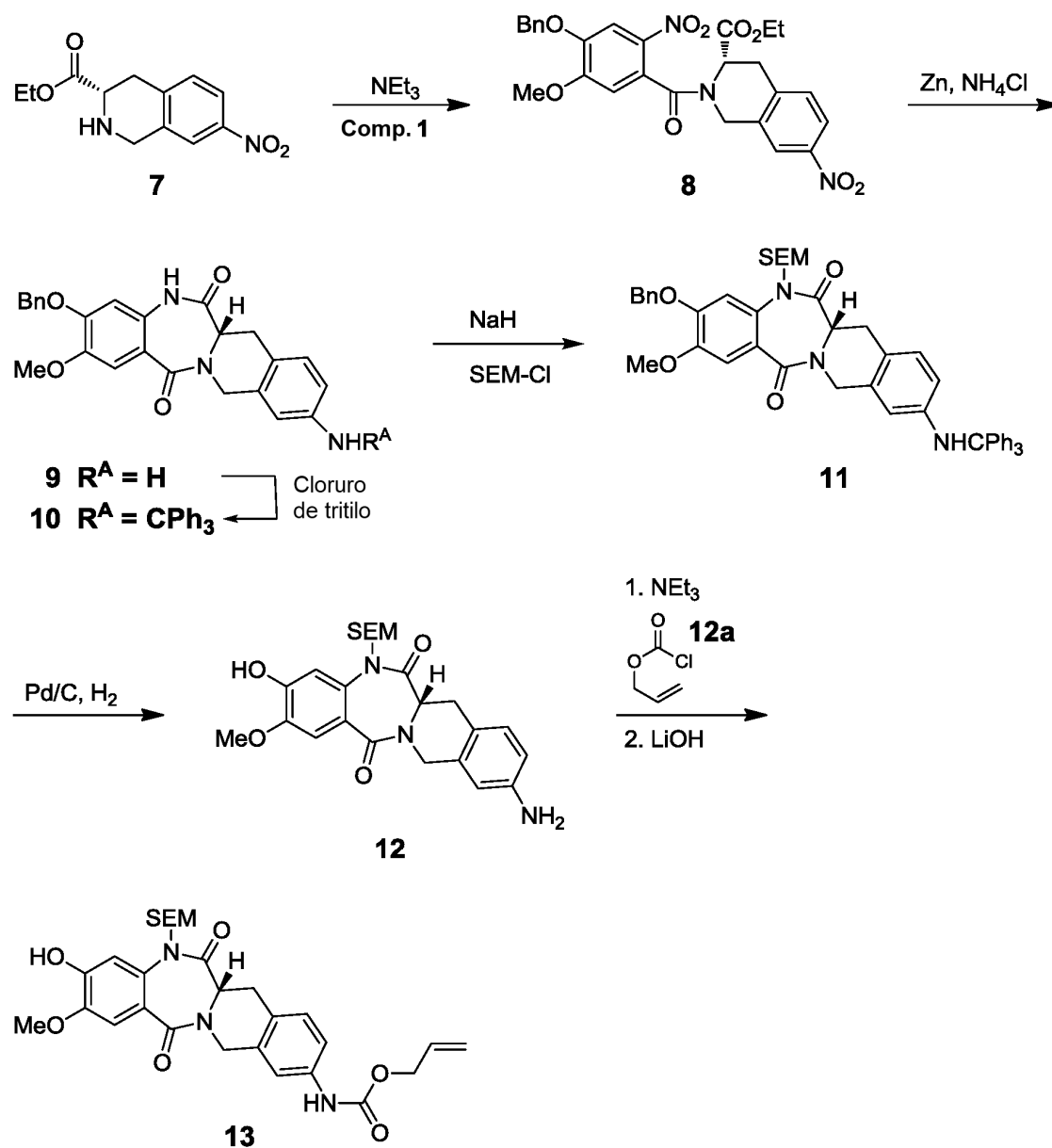
en la que

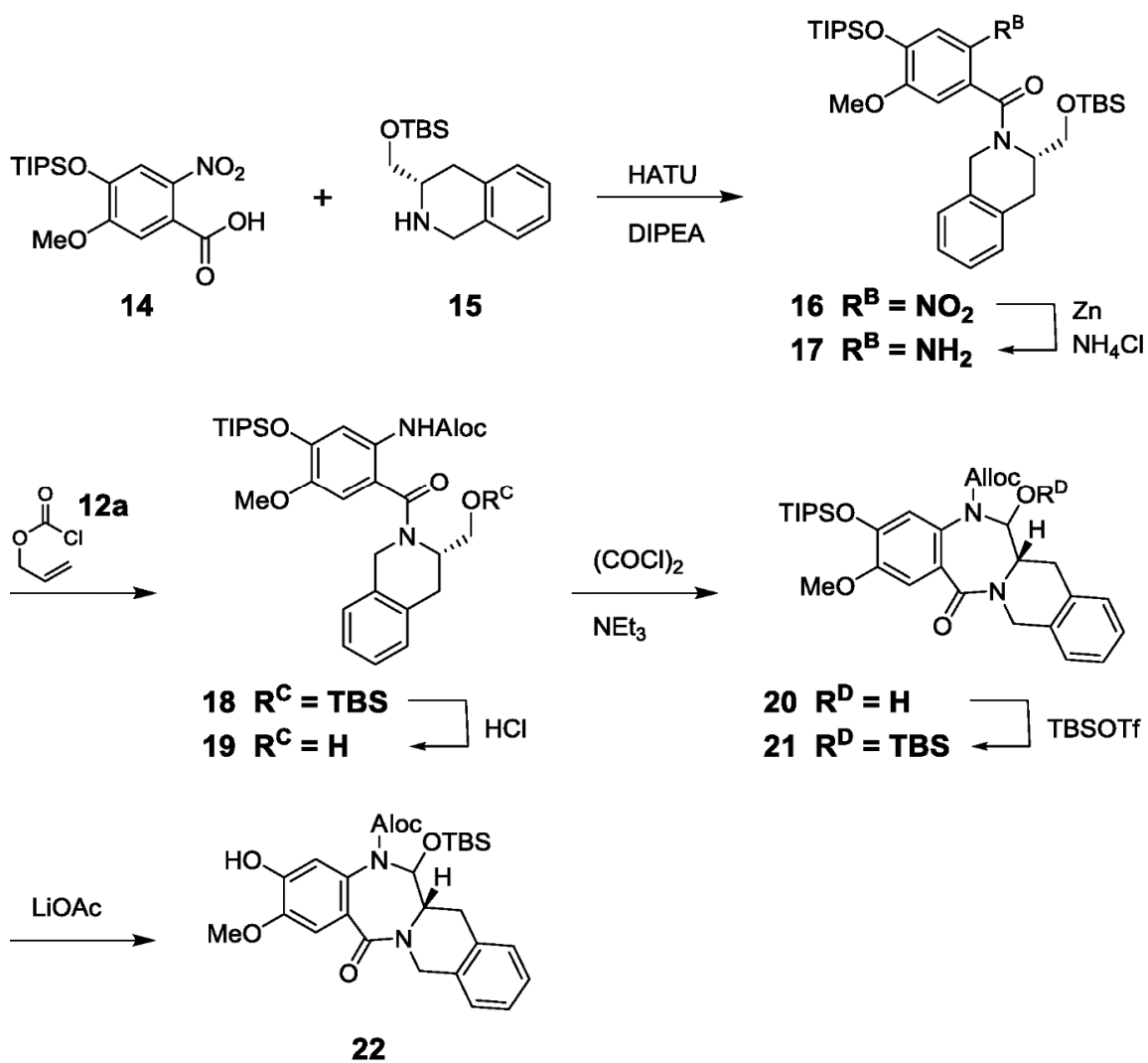
- 5  $X^3$  es H, OH, OMe, Me,  $CH_2OH$ , O(alilo), Cl o  $CO_2Me$ ;  
 al menos una de las líneas dobles  $\equiv$  en un sistema de anillo de diazepina es un doble enlace;  
 $R^5$  es H si la línea doble  $\equiv$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;  
 $R^6$  es H si la línea doble  $\equiv$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace; y  
 10  $R^9$  es H, OH, OMe, alquilo  $C_1-C_3$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ , F, Cl o Br;

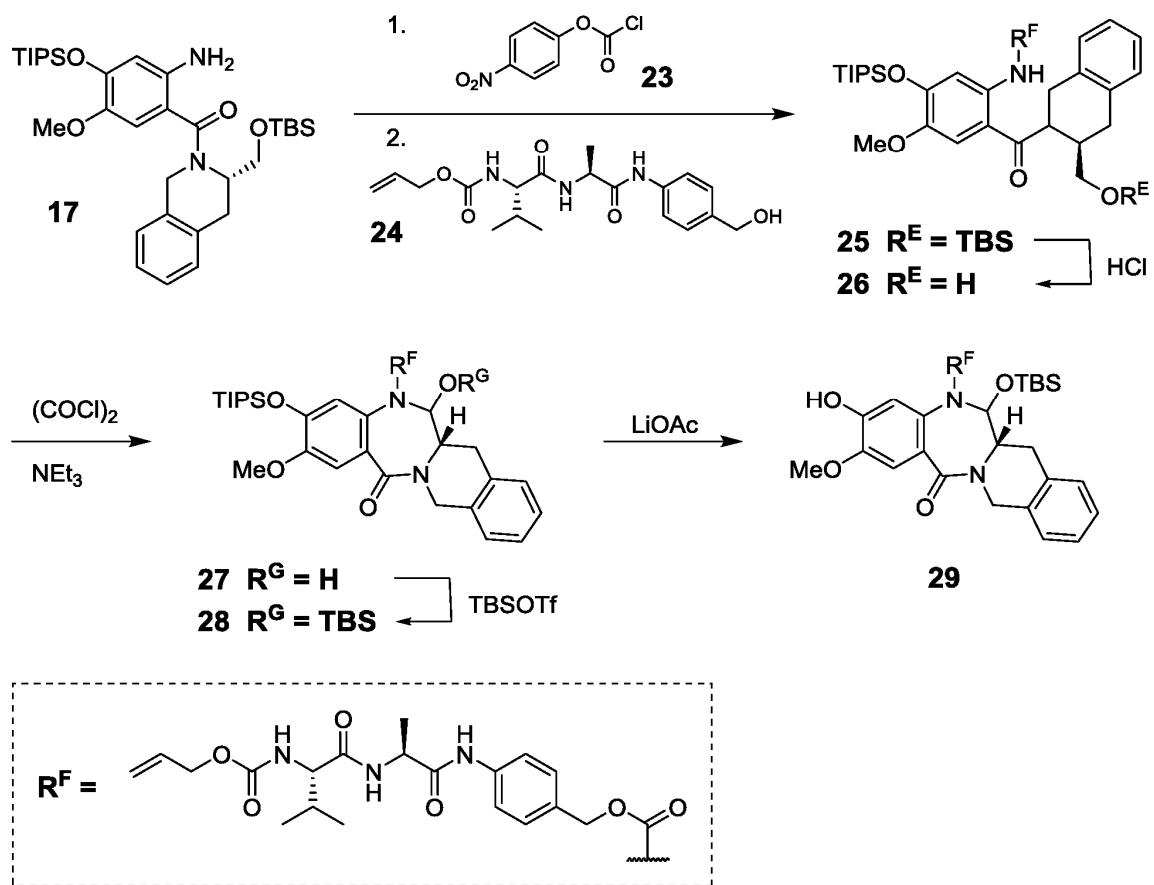
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 16. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
17. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer.
- 20 18. El conjugado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el cáncer es cáncer de pulmón o gástrico.

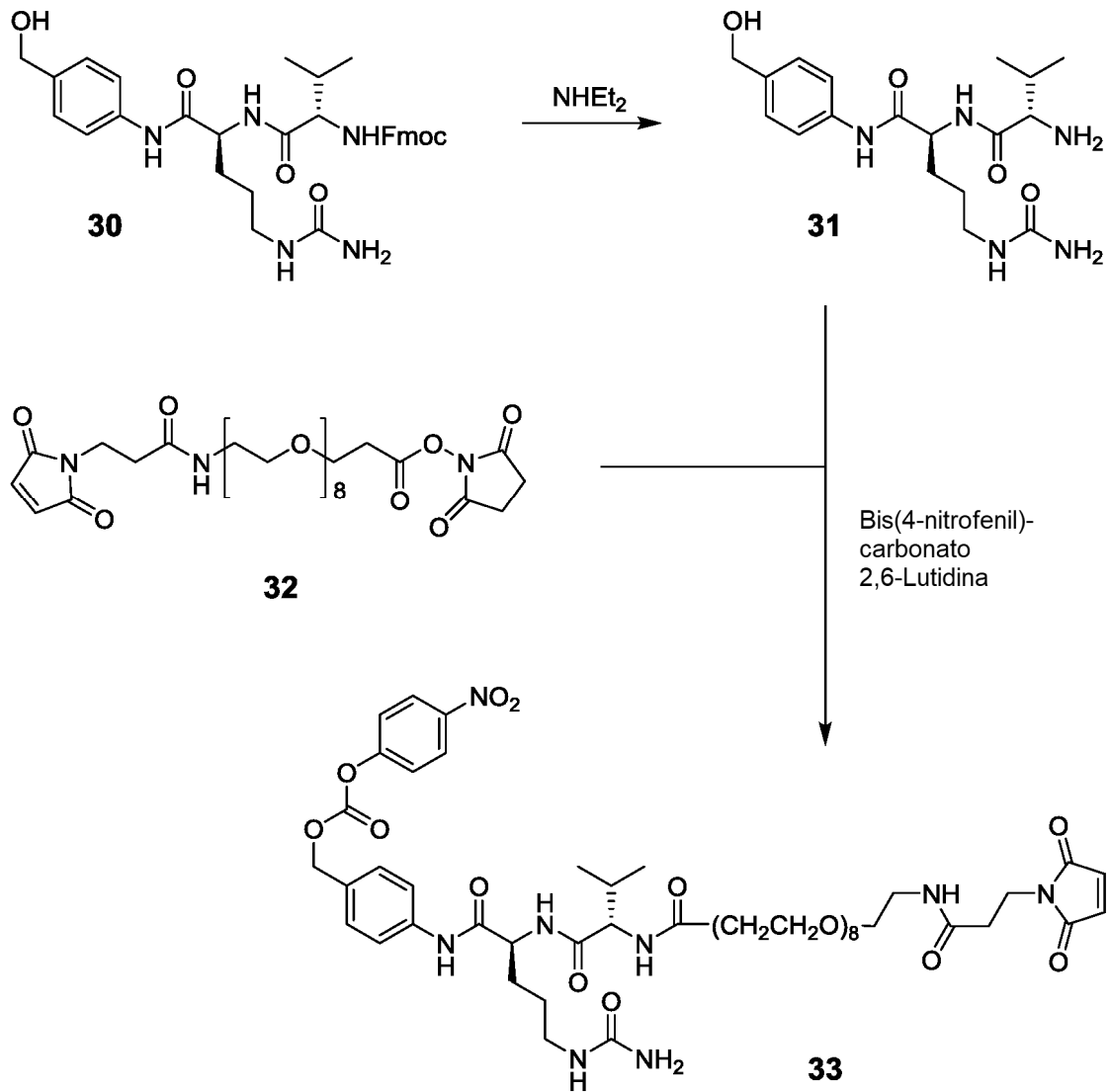
**Fig. 1**

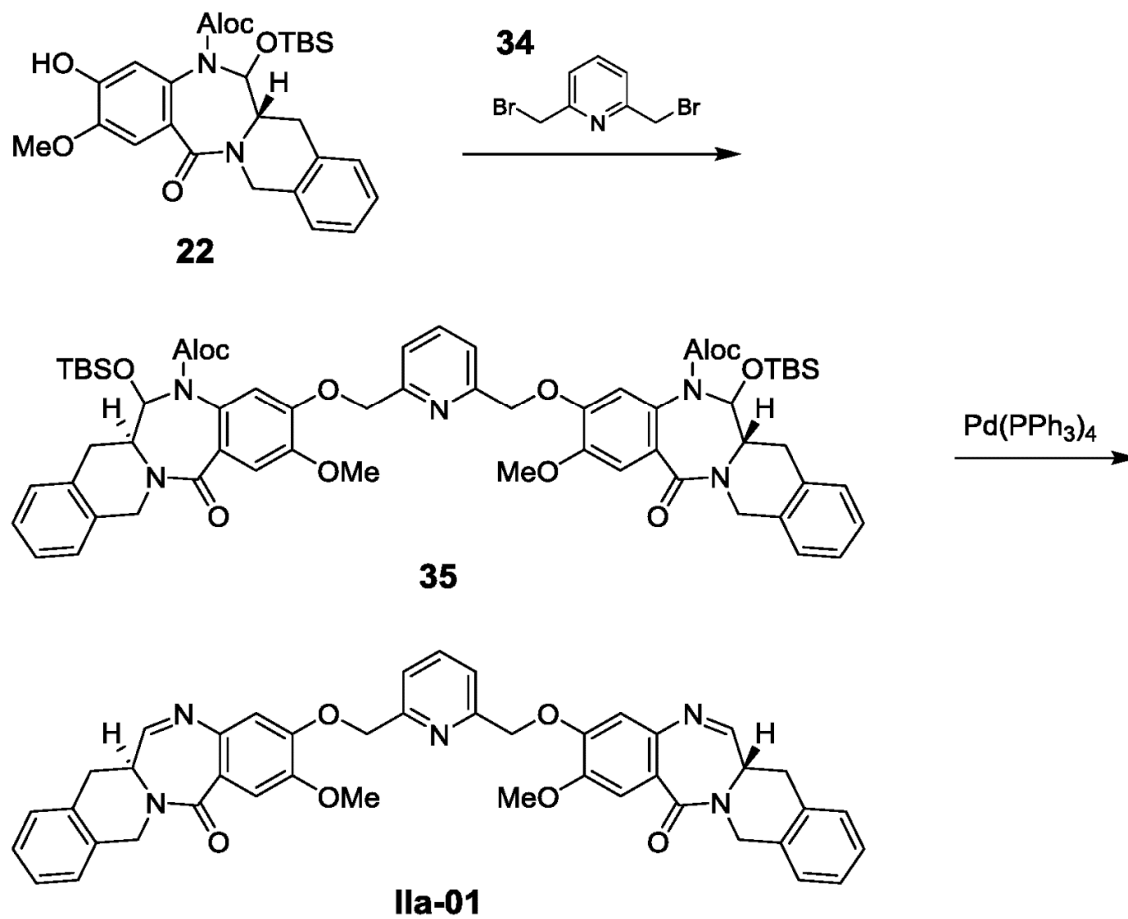
**Fig. 2**

**Fig. 3**

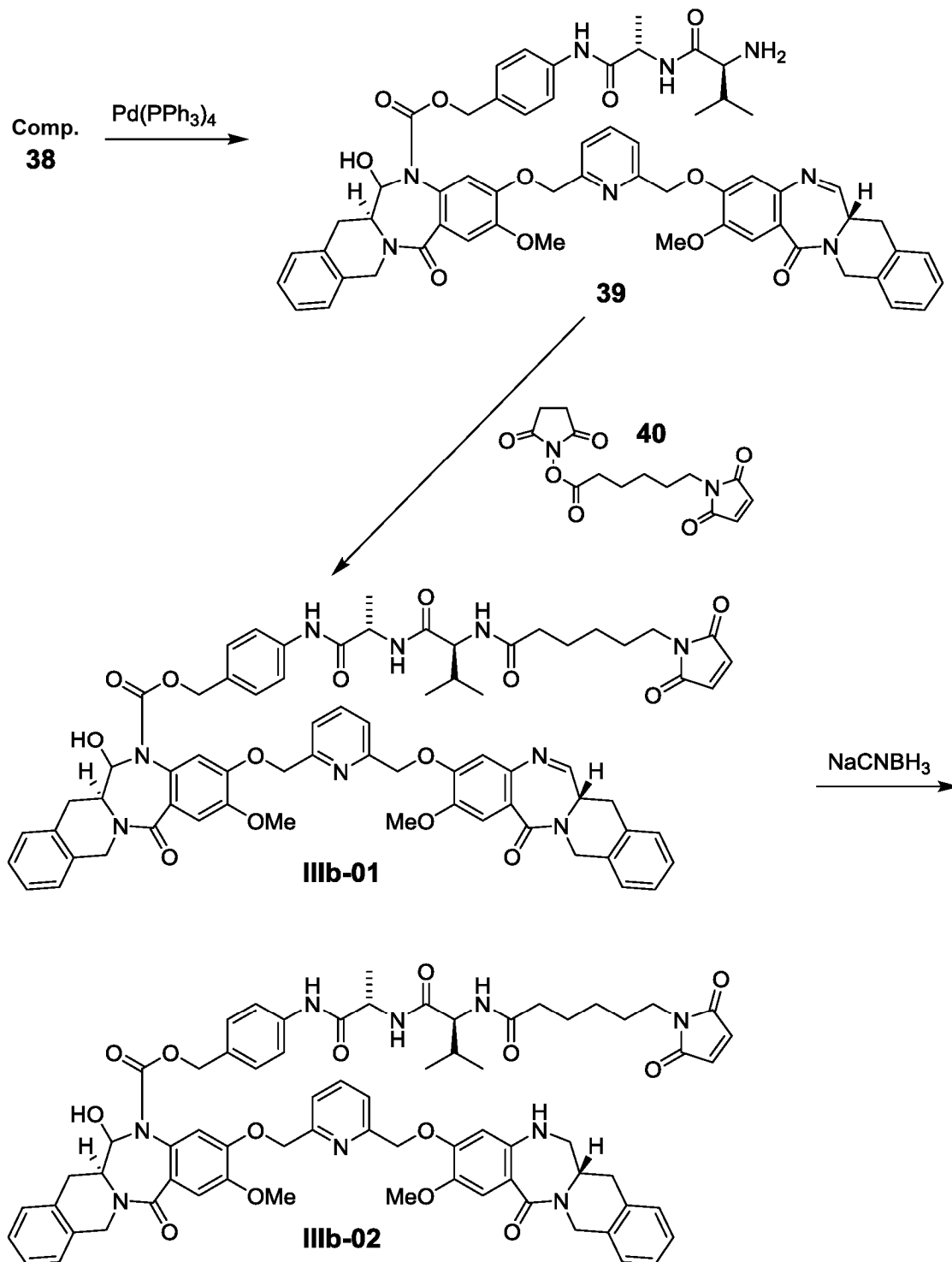
**Fig. 4**

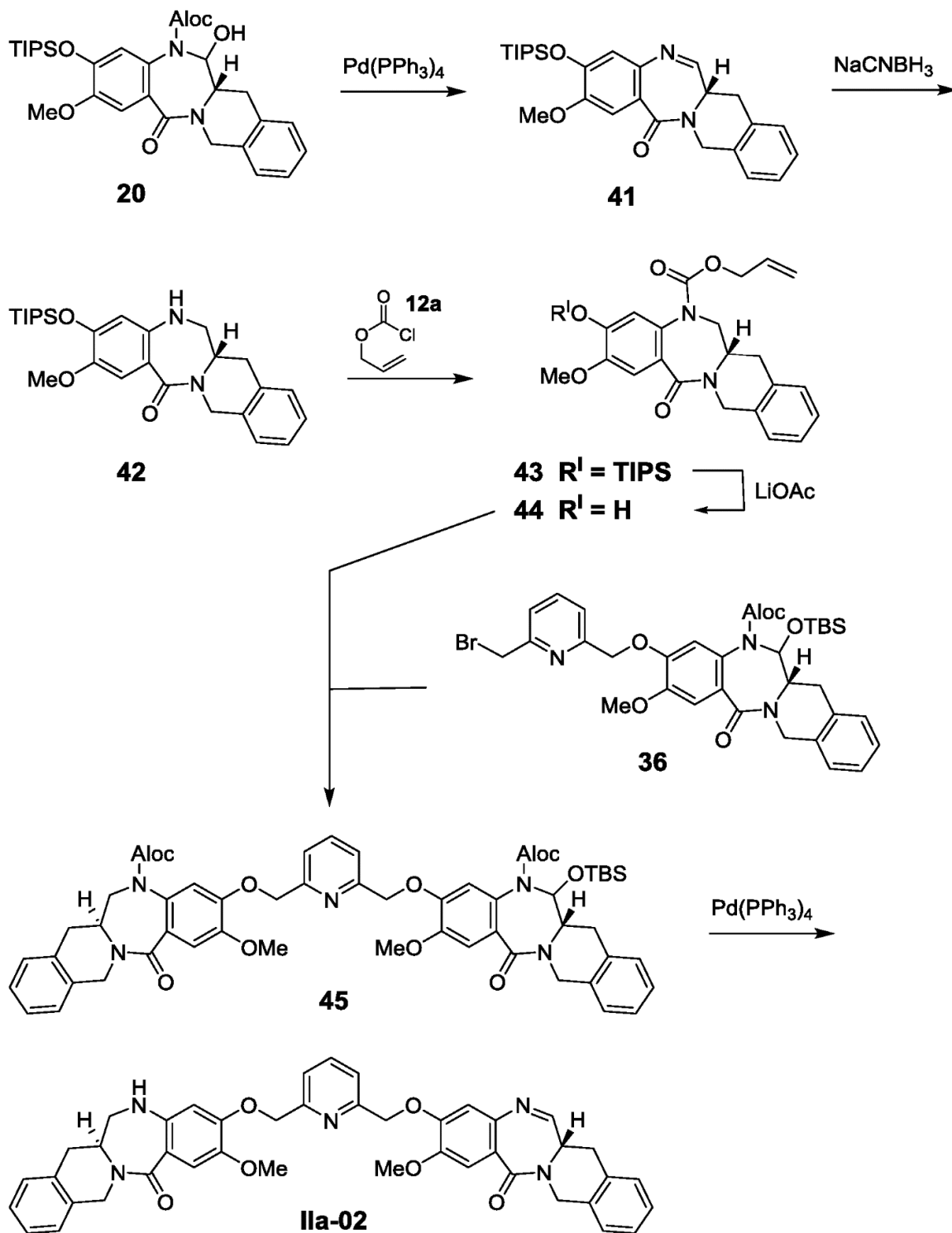


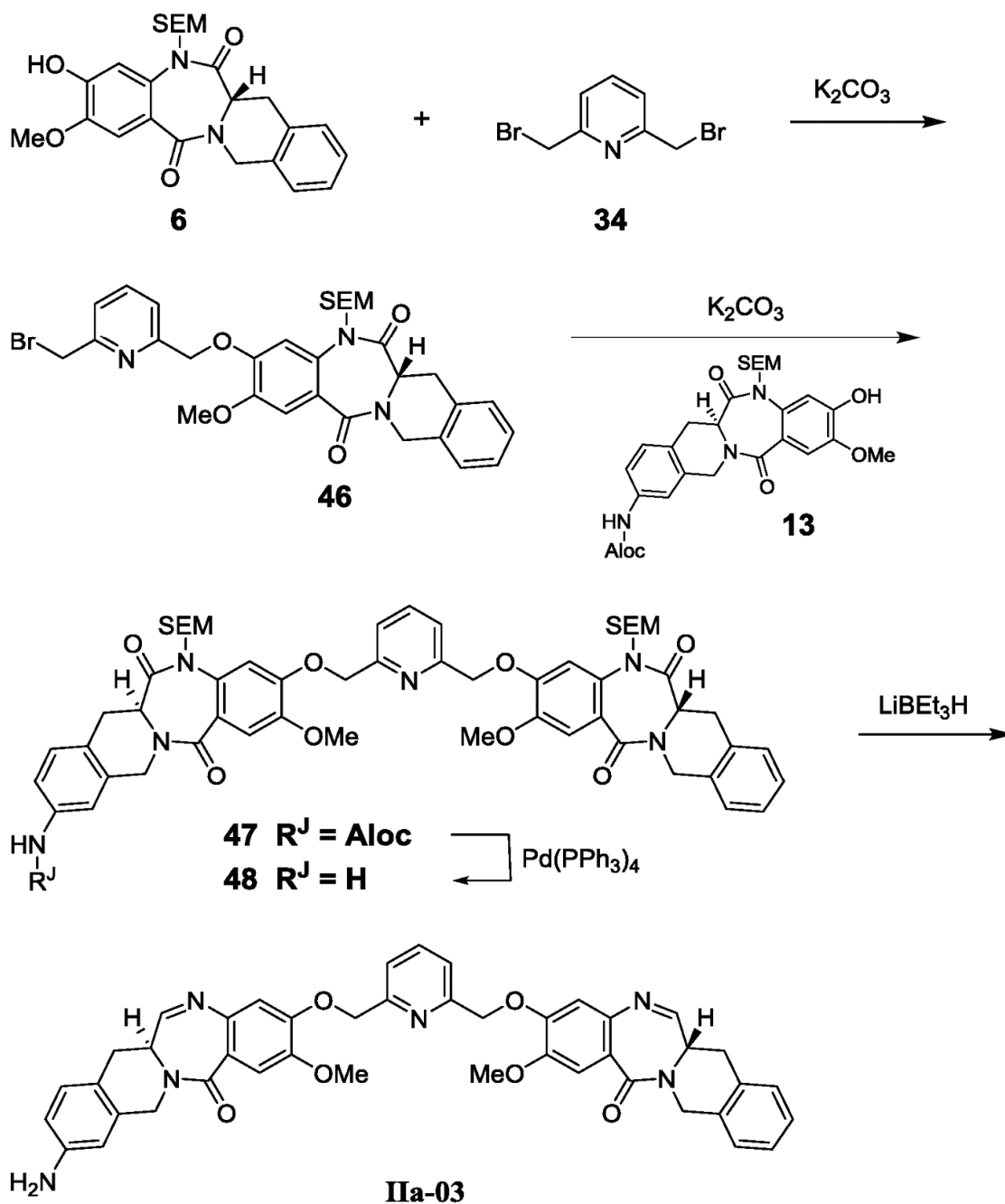
**Fig. 5**

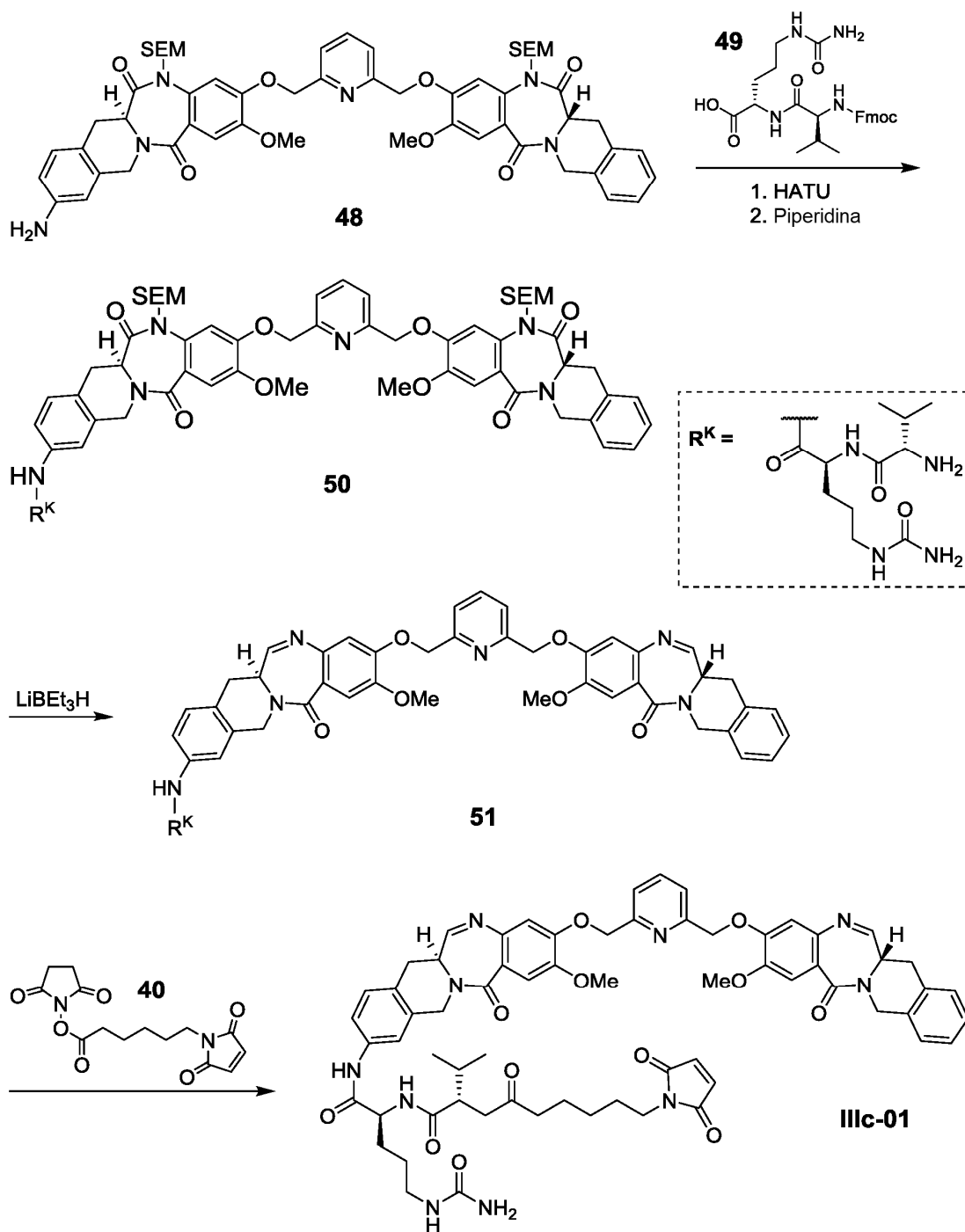
**Fig. 6**

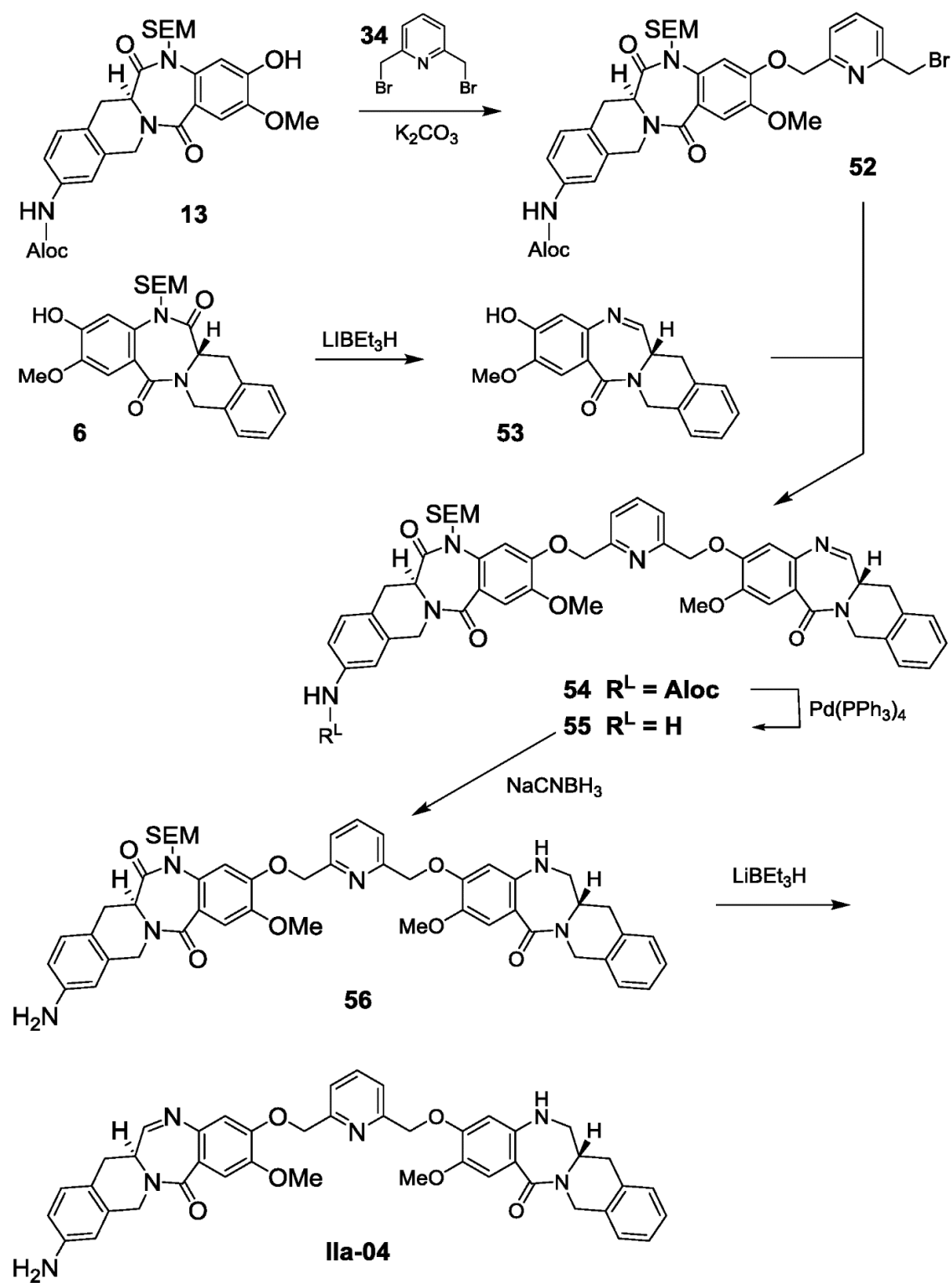


**Fig. 7B**

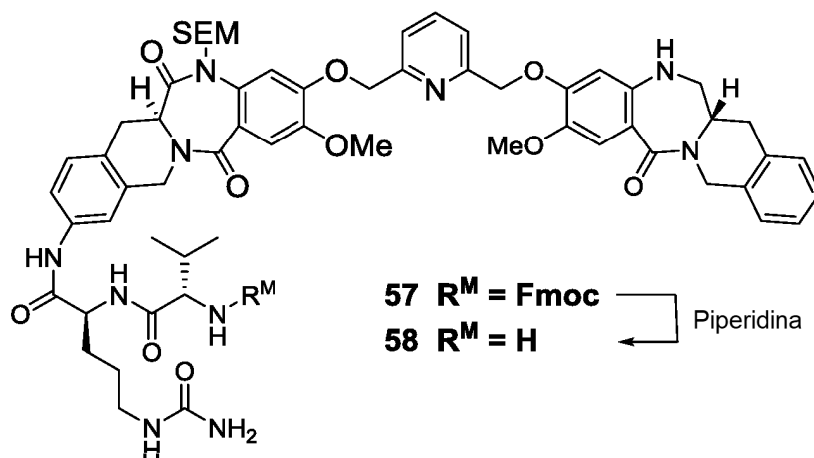
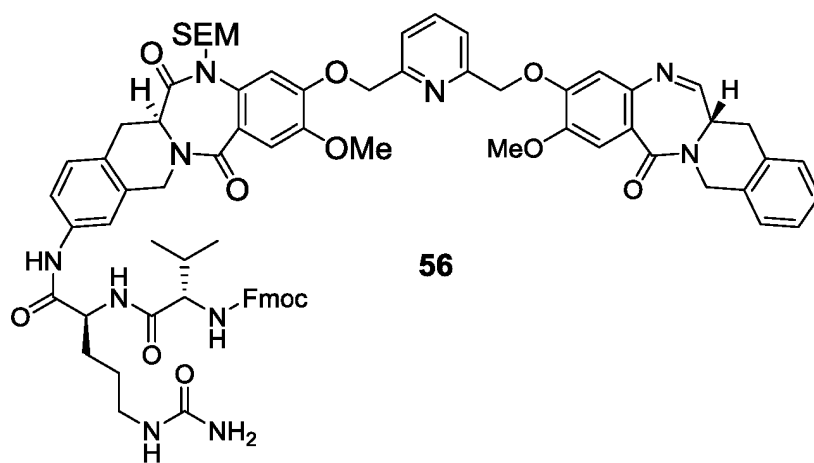
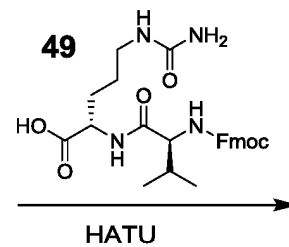
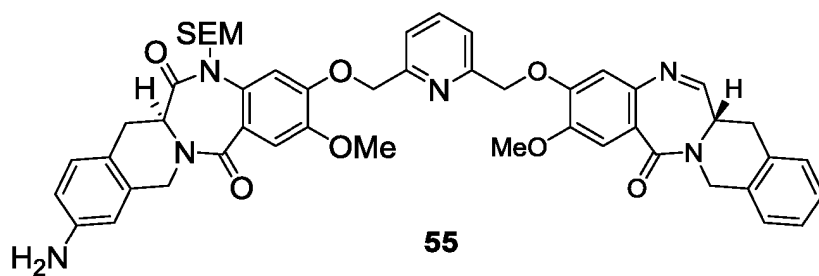
**Fig. 8**

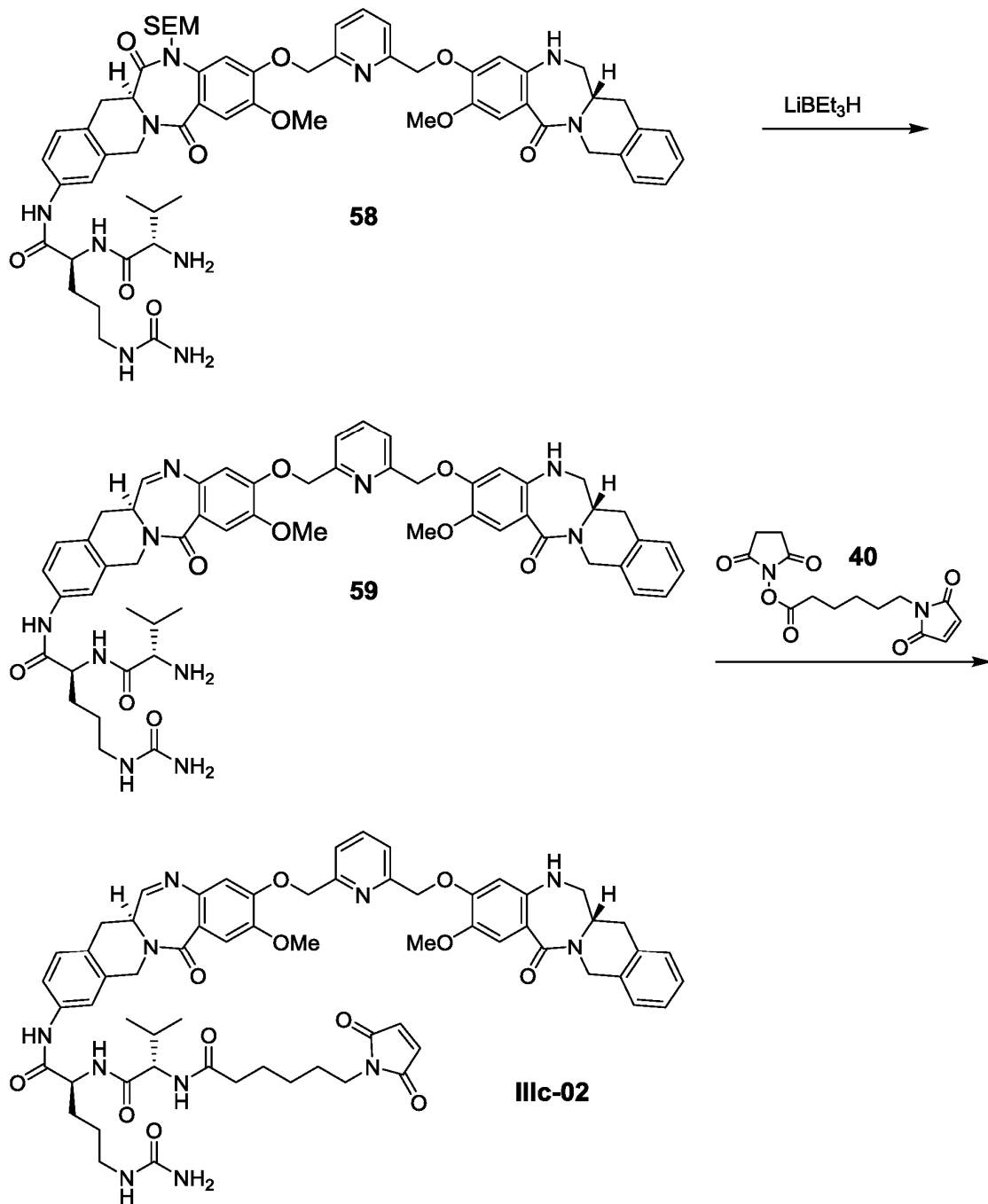
**Fig. 9**

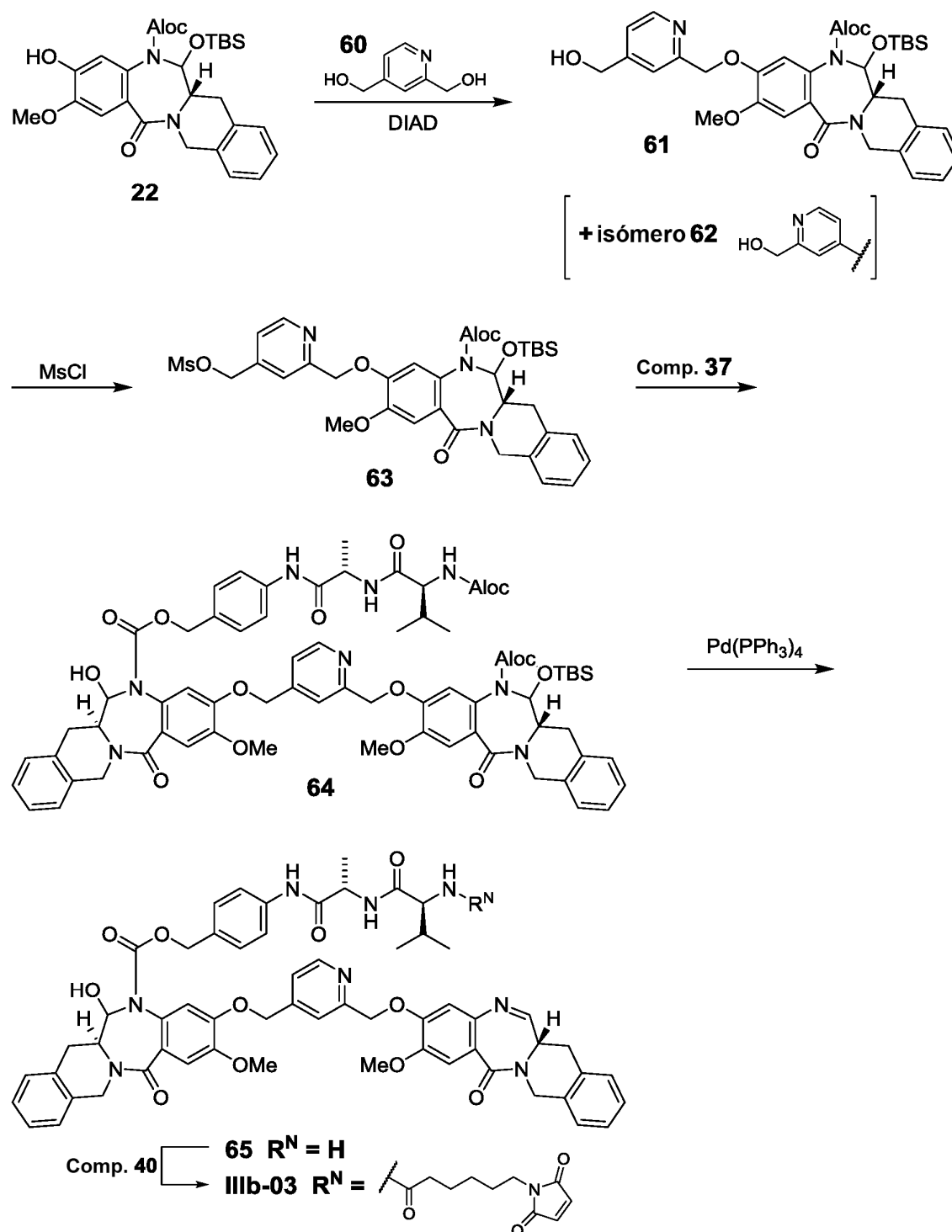
**Fig. 10**

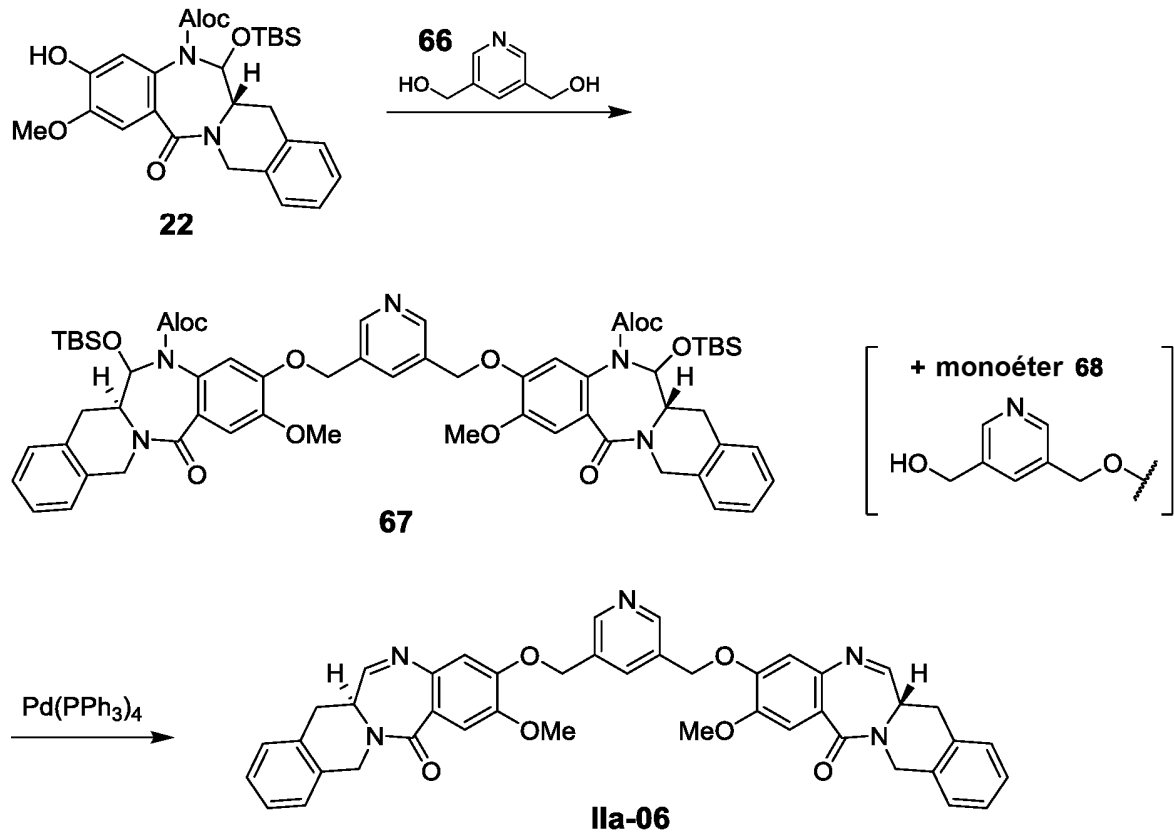
**Fig. 11**

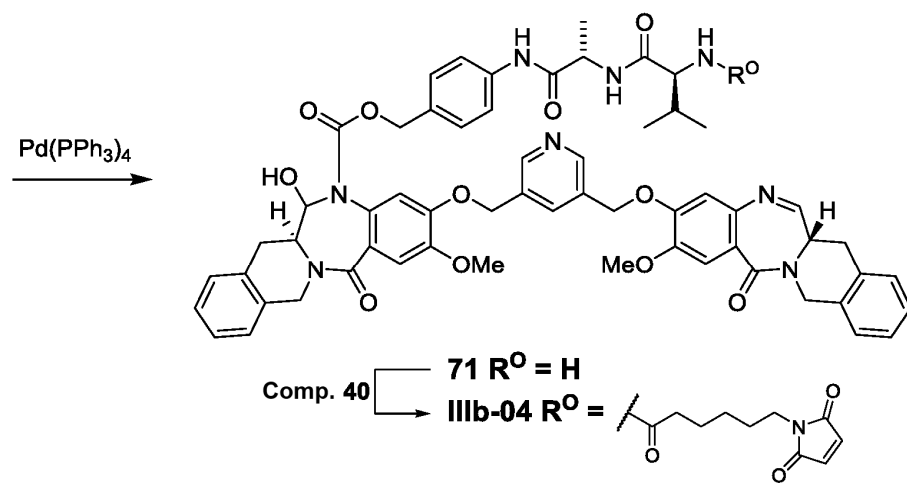
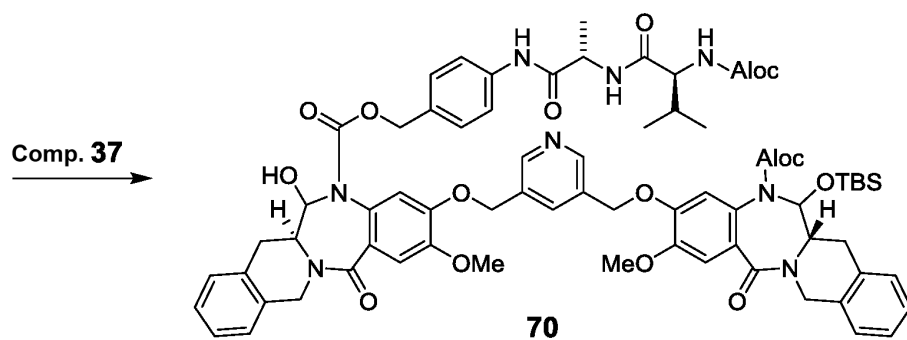
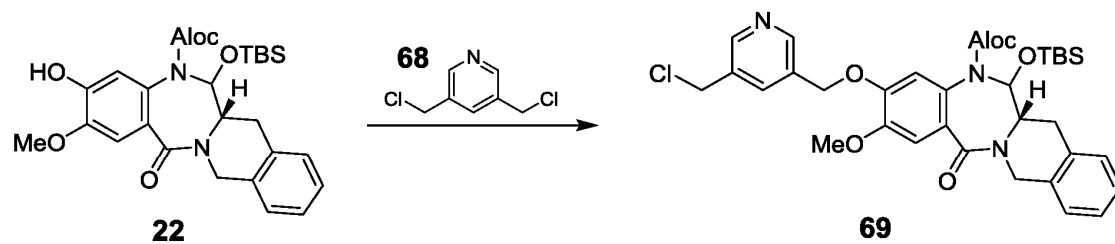


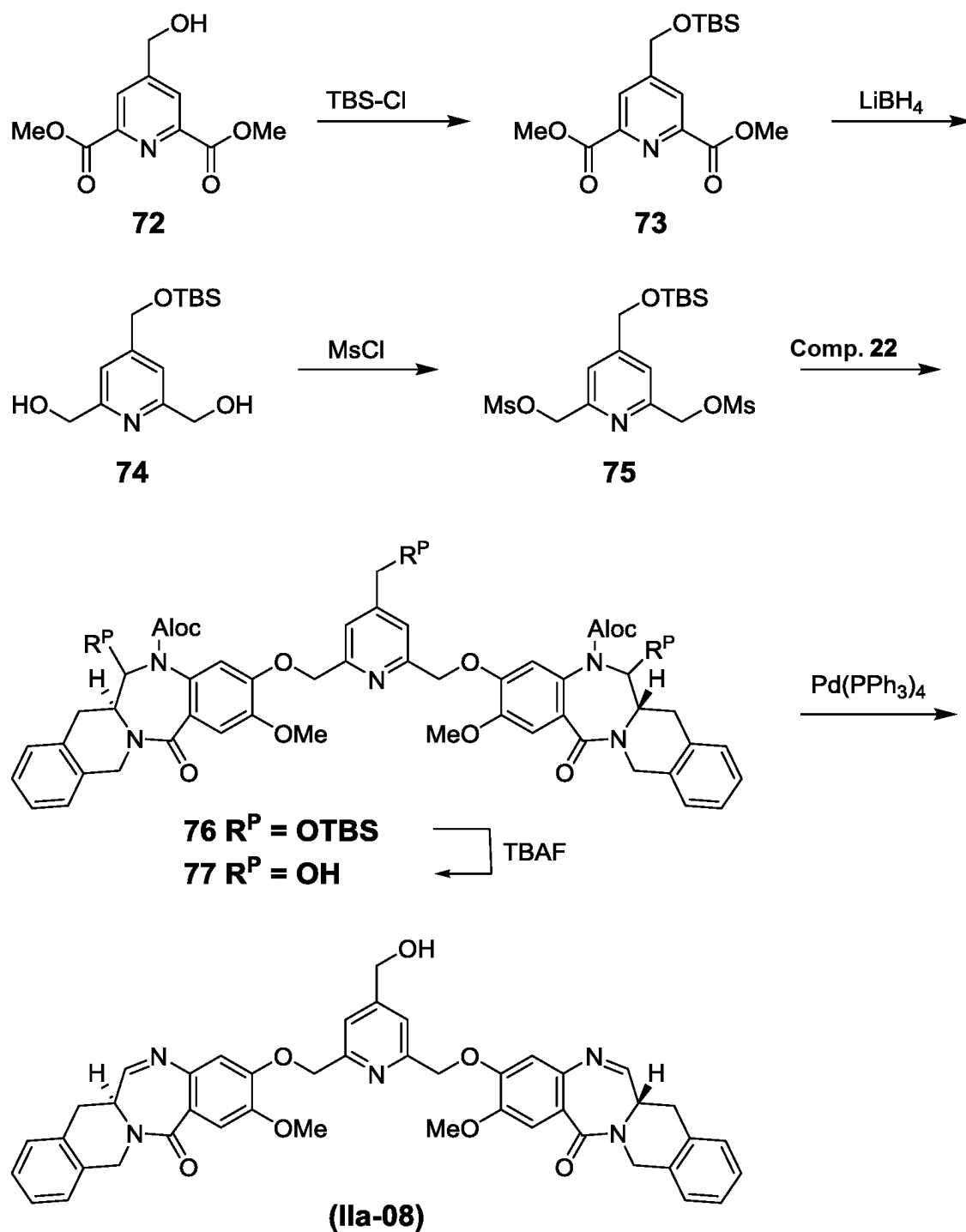
**Fig. 12A**

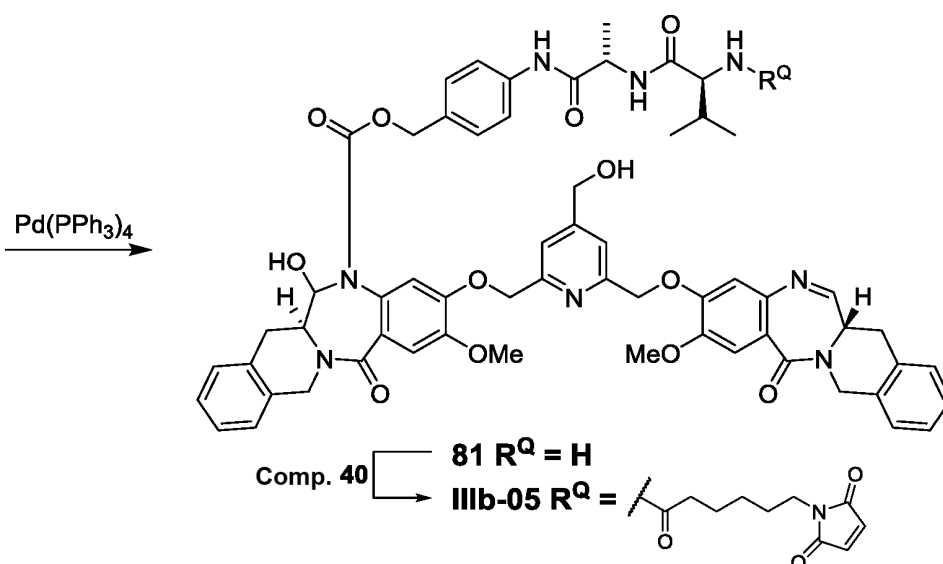
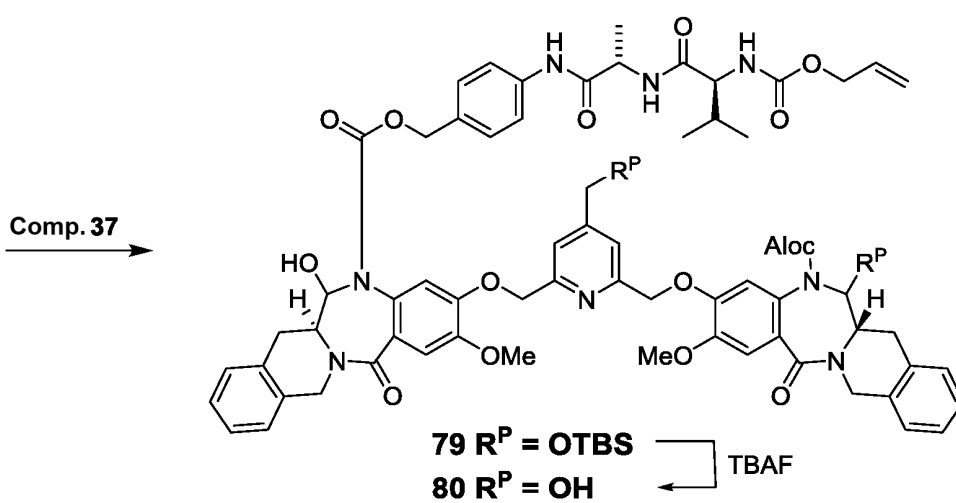
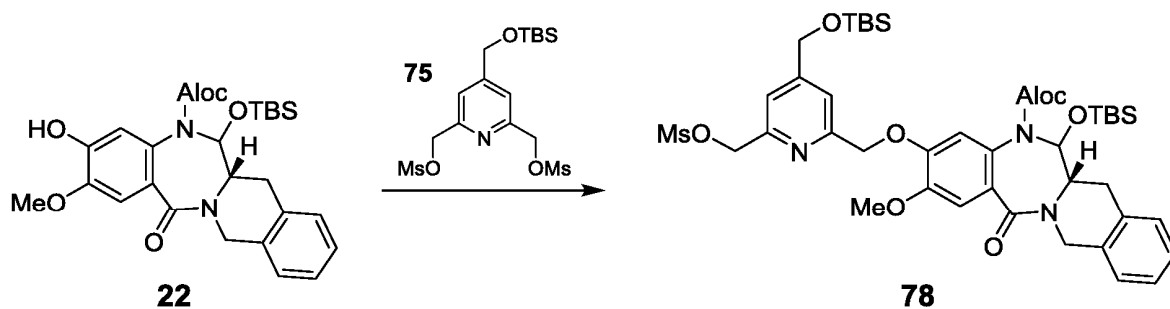
**Fig. 12B**

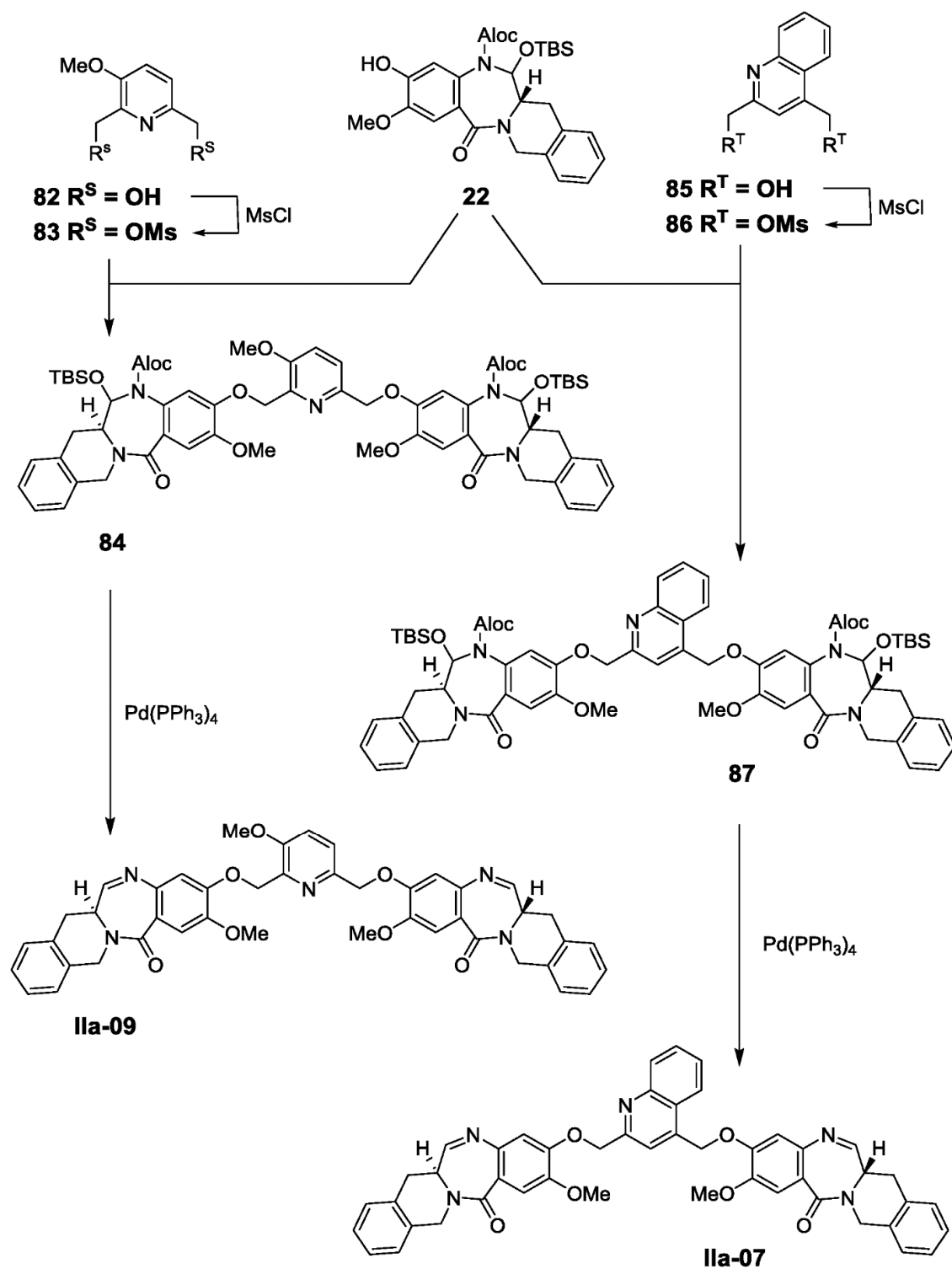
**Fig. 13**

**Fig. 14**

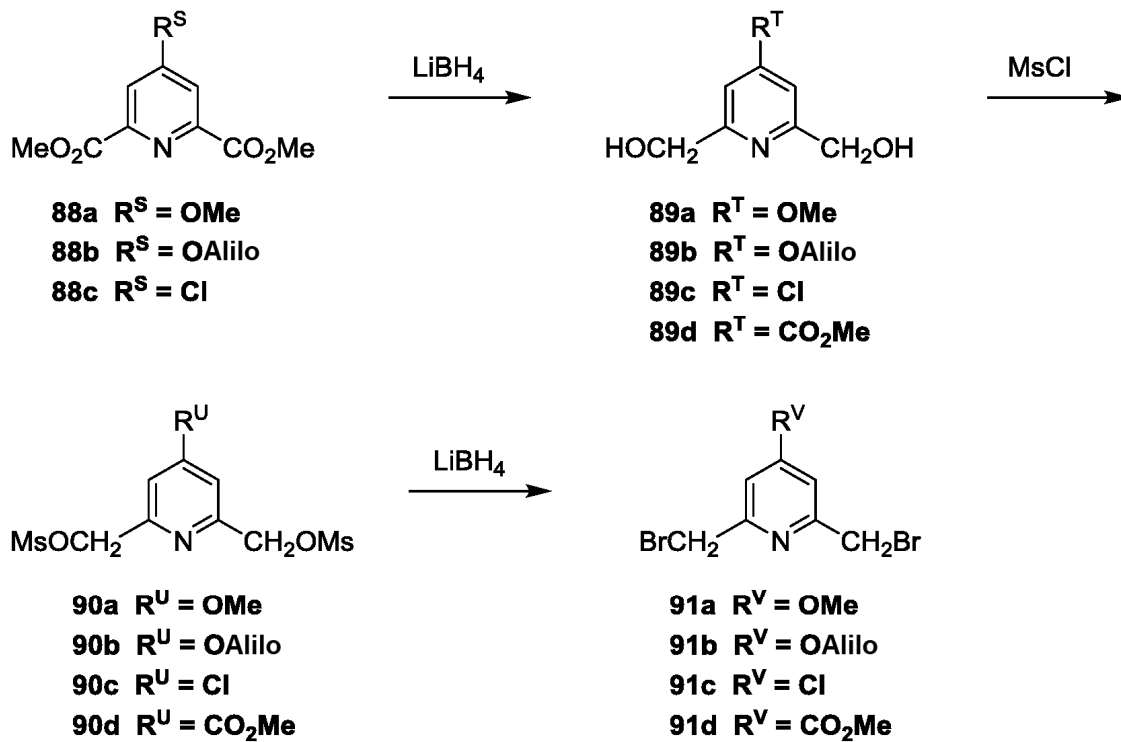
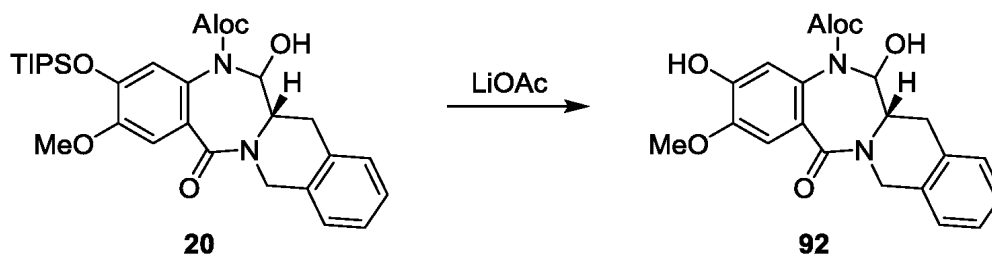
**Fig. 15**

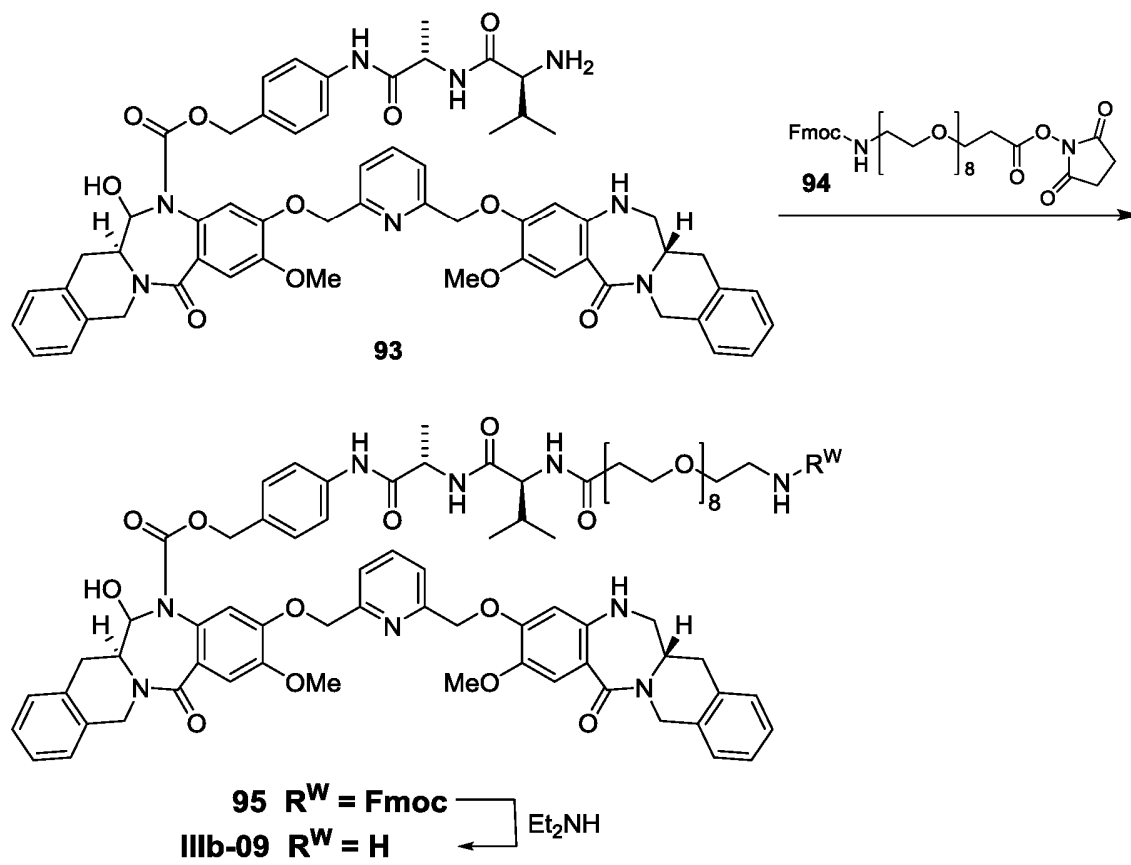
**Fig. 16**

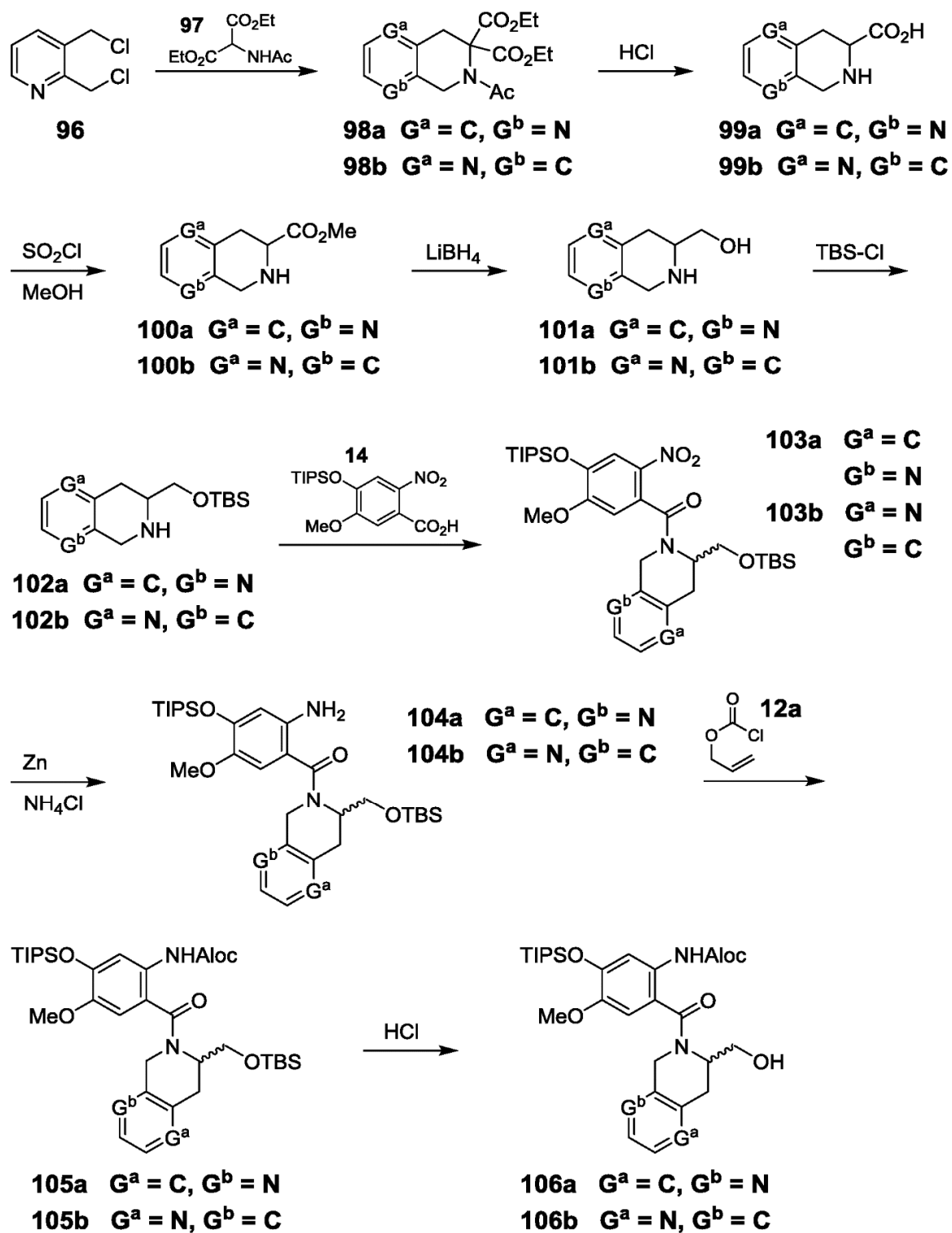
**Fig. 17**

**Fig. 18**



**Fig. 19A****Fig. 19B**

**Fig. 20**

**Fig. 21**

**Fig. 22**