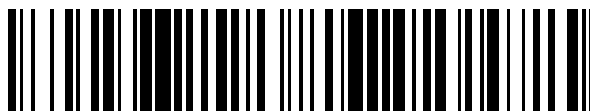


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 045**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

**C07D 309/32** (2006.01)

**C07D 309/30** (2006.01)

**C07D 405/12** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2014 PCT/EP2014/061392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2014 E 14732514 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3003386**

54 Título: **Conjugados fármaco-anticuerpo**

30 Prioridad:

**31.05.2013 GB 201309807**

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

**07.08.2020**

73 Titular/es:

**PHARMA MAR, S.A. (100.0%)  
Pol. Ind. La Mina, Avda. de los Reyes, 1  
28770 Colmenar Viejo (Madrid), ES**

72 Inventor/es:

**CUEVAS MARCHANTE, CÁRMEN;  
DOMÍNGUEZ CORREA, JUAN MANUEL;  
FRANCESCH SOLLOSO, ANDRÉS;  
GARRANZO GARCÍA-IBARROLA, MARÍA;  
MUNOZ ALONSO, MARÍA JOSÉ;  
SÁNCHEZ MADRID, FRANCISCO;  
ZAPATA HERNÁNDEZ, JUAN MANUEL;  
GARCÍA ARROYO, ALICIA y  
URSA PECHARROMÁN, MARIA ÁNGELES**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 778 045 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**

Conjugados fármaco-anticuerpo

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a conjugados de fármaco novedosos, a compuestos de unión a fármacos, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos conjugados de fármaco y a su uso como antineoplásicos.

**Antecedentes de la invención**

10 Las publicaciones internacionales números WO-A-2007/144423 y WO-A-2009/080761 dan a conocer derivados de dihidropiran-2-ona y tetrahidropiran-2-ona novedosos que demuestran una actividad antitumoral muy prometedora. PM060184 dado a conocer en el documento WO-A-2007/144423 está en la actualidad en ensayos clínicos de fase I para la prevención y el tratamiento de tumores sólidos.

15 El tratamiento de cáncer ha progresado significativamente en los últimos años con el desarrollo de entidades farmacéuticas que seleccionan como diana y destruyen células cancerosas de manera más eficaz. Los investigadores se han aprovechado de los receptores de la superficie celular y los antígenos expresados de manera selectiva por células diana tales como células cancerosas para desarrollar entidades farmacéuticas basándose en anticuerpos que se unen a, en el ejemplo de tumores, los antígenos específicos de tumores o asociados a tumores. Para lograr esto, moléculas citotóxicas tales como fármacos quimioterápicos, toxinas bacterianas y vegetales y radionúclidos se han unido químicamente a anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos de la superficie celular específicos de tumores o asociados a tumores (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente internacionales WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533, WO-A-2007/024536 y la solicitud de patente europea EP 20 1864682 A1). Tales compuestos se denominan normalmente "conjugados" de fármacos, toxinas y radionúclidos. La destrucción de una célula tumoral se produce tras la unión del conjugado de fármaco a una célula tumoral y la liberación o/y la activación de la actividad citotóxica del resto de fármaco. La selectividad proporcionada por los conjugados de fármaco minimiza la toxicidad en células normales, potenciándose de ese modo la tolerabilidad del fármaco en el paciente. Tres ejemplos de conjugados fármaco-anticuerpo de este tipo que han recibido autorización de comercialización son: gemtuzumab ozogamicina para leucemia mielógena aguda, brentuximab vedotin para 25 linfoma de Hodgkin con recidiva y resistente al tratamiento y linfoma anaplásico de células grandes, y adotrastuzumab emtansina para cáncer de mama, especialmente HER2+.

30 La eficacia de los fármacos para quimioterapia contra el cáncer generalmente cuenta con las diferencias en las tasas de crecimiento, rutas bioquímicas y características fisiológicas entre el cáncer y los tejidos normales. Por consiguiente, la mayoría de los agentes quimioterápicos convencionales son relativamente no específicos y presentan toxicidades limitantes de dosis que contribuyen a efectos terapéuticos subóptimos. Un enfoque para seleccionar como diana de manera selectiva células malignas y no tejidos sanos es usar anticuerpos monoclonales (AcM) específicos que reconocen antígenos asociados a tumores expresados sobre la superficie de células tumorales [Meyer, D.L. & Senter, P.D. (2003) Recent advances in antibody drug conjugates cancer therapy. Annu. Rep. Med. Chem., 38, 229-237; Chari, R.V. (2008) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Acc. Chem. Res. 41, 98-107]. Los AcM y derivados son en la actualidad la clase de moléculas terapéuticas de crecimiento más rápido. Más de 30 inmunoglobulinas de tipo G (IgG) y agentes relacionados se han aprobado a lo largo de los últimos 25 años principalmente para cánceres y enfermedades inflamatorias. En oncología, los AcM se combinan a menudo con fármacos citotóxicos para potenciar su eficacia terapéutica. Alternativamente, pequeñas 40 moléculas antineoplásicas pueden conjugarse químicamente con AcM, usados tanto como portadores (semivida aumentada) y como agentes de direccionamiento (selectividad). Se ha dirigido un esfuerzo considerable hacia el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) para la administración dirigida de fármacos debido a sus altas selectividades para antígenos asociados a tumores, farmacocinética favorable y toxicidades intrínsecas relativamente bajas. Los conjugados AcM-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) se forman uniendo covalentemente antineoplásicos a AcM, habitualmente a través de un sistema de unión estable de manera condicional. Tras la unión a los antígenos de la superficie celular, los AcM usados para la mayoría de ADC se transportan de manera activa a lisosomas u otros 45 compartimentos intracelulares, en los que las enzimas, el pH bajo o los agentes reductores facilitan la liberación de fármacos.

50 Los antígenos deben tener alta selectividad hacia células tumorales para limitar la toxicidad y los efectos fuera de la diana. Se han investigado una multitud de antígenos asociados a tumores en modelos con animales y en ensayos clínicos que incluyen antígenos sobreexpresados en células B (por ejemplo, CD20, CD22, CD40, CD79), células T (CD25, CD30), células de carcinoma (HER2, EGFR, EpCAM, EphB2, PSMA), células endoteliales (endogлина) o estromales (fibroblastos activados por proteínas), por nombrar unos pocos [Teicher BA. Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9(8):982-1004, 2009]. Una propiedad principal y crítica para las dianas de ADC es su capacidad para internalizarse; esto puede ser una característica intrínseca del propio antígeno, o puede inducirse por la unión del anticuerpo a su antígeno. De hecho, la internalización de ADC es crucial para reducir la toxicidad asociada con una administración extracelular de la carga útil del fármaco.

En cuanto a las moléculas pequeñas conjugadas y al contrario que la inmensa variedad de supuestas dianas de

antígenos, un número limitado de familias de fármacos citotóxicos usados como cargas útiles en ADC se investigan de manera activa en la actualidad en ensayos clínicos: caliqueamicina (Pfizer), duocarmicinas (Synthon), pirrolobenzodiazepinas (Spirogen), irinotecán (Immunomedics), maitansinoides (DM1 y DM4; ImmunoGen + Genentech/Roche, Sanofi-Aventis, Biogen Idec, Centocor/Johnson & Johnson, Millennium/Takeda) y auristatinas (MMAE y MMAF; Seattle Genetics + Genentech/Roche, MedImmune/AstraZeneca, Bayer-Schering, Celldex, Progenies, Genmab). Caliqueamicina, duocarmicinas y pirrolobenzodiazepinas son proteínas de unión del surco menor del ADN, irinotecán es un inhibidor de la topoisomerasa I, mientras que los maitansinoides y las auristatinas son agentes de despolimerización de tubulina. Una de sus características comunes es su alta potencia de fármaco libre (de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-11</sup> M) en comparación, por ejemplo, con la doxorubicina (10<sup>-7</sup> M) usada en los ADC de primera generación. Otro elemento clave para el éxito es el conocimiento claro de una posición "permissiva" para la unión del grupo de unión que permite la liberación de metabolitos activos, similares a los profármacos tradicionales.

De manera interesante, un representante de tres de estos ADC derivados de citotóxicos ha alcanzado los ensayos clínicos de última fase. Trastuzumab emtansina (T-DM1), trastuzumab unido a un fármaco hemisintético de maitansinoides mediante un grupo de unión estable (autorización de la FDA el 22 de febrero de 2013 para cáncer de mama HER2 positivo avanzado); inotuzumab ozogamicina (CMC-544), un AcM anti-CD22 humanizado (G5/44, IgG4) conjugado con caliqueamicina con un grupo de unión lábil ácido (acetilfenoxi-butanoico) (linfoma no Hodgkin de células B); brentuximab vedotin, un AcM anti-CD30 humanizado unido a monometil auristatina E (MMAE), a través de un grupo de unión maleimidacaproil-valil-citrulinil-p-aminobencilcarbamato (autorización de la FDA el 19 de agosto de 2011 para linfoma anaplásico de células grandes y linfoma de Hodgkin).

Los grupos de unión representan el componente clave de las estructuras de los ADC. Se han investigado varias clases de grupos de unión de segunda generación, incluyendo grupos de unión de hidrazona lábiles ácidos (lisosomas) (por ejemplo, gemtuzumab e inotuzumab ozogamicina); grupos de unión a base de disulfuro (entorno intracelular reductor); grupos de unión de tioéter no escindibles (degradación catabólica en lisosomas) (por ejemplo, trastuzumab emtansina); grupos de unión peptídicos (por ejemplo, citrulina-valina) (proteasas lisosómicas similares a catépsina B) (por ejemplo, brentuximab vedotin): véanse, por ejemplo, los documentos WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533 y WO-A-2007/024536. Se ha descrito también la purificación de conjugados anticuerpo-fármaco por cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés) [véase, por ejemplo, Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Set (EE.UU.), 93: 8618-8623 (1996), y Chari *et al.*, Cancer Research, 52: 127-131 (1992)].

Trastuzumab (Herceptin) es un anticuerpo monoclonal que interfiere con el receptor de HER2/neu. Su uso principal es tratar determinados cánceres de mama. Los receptores de HER son proteínas que están embebidas en la membrana celular y comunican señales moleculares desde el exterior de la célula (moléculas denominadas EGF, por sus siglas en inglés) al interior de la célula, y enciende y apaga los genes. Las proteínas HER estimulan la proliferación celular. En algunos cánceres, en particular determinados tipos de cáncer de mama, HER2 se sobreexpresa, y produce células cancerosas que se reproducen de manera incontrolable.

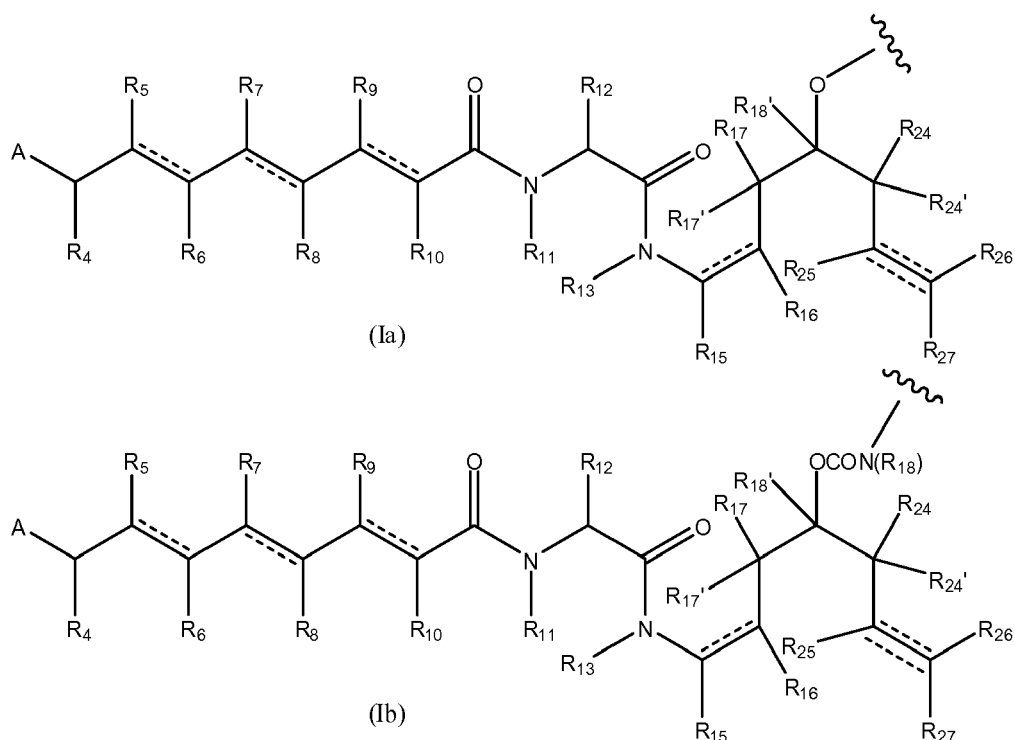
El gen HER2 se amplifica en el 20-30% de los cánceres de mama en estado inicial, que hace que se sobreexpresen receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la membrana celular. En algunos tipos de cáncer, HER2 puede mandar señales sin que los factores de crecimiento lleguen y se unan al receptor, haciendo que su efecto en la célula sea constitutivo; sin embargo, trastuzumab no es eficaz en este caso.

La ruta de HER2 fomenta el crecimiento y la división celular cuando funciona normalmente; sin embargo, cuando se sobreexpresa, acelera el crecimiento celular más allá de sus límites normales. En algunos tipos de cáncer, la ruta se aprovecha para fomentar el crecimiento y la proliferación celular rápidos y, por tanto, la formación de tumores. En células cancerosas la proteína HER2 puede expresarse hasta 100 veces más que en células normales (2 millones frente a 20.000 por célula). Esta sobreexpresión conduce a una señalización proliferativa fuerte y constante y, por tanto, a la formación de tumores. La sobreexpresión de HER2 también produce la desactivación de puntos de control, lo que permite un aumento incluso mayor en la proliferación.

### Sumario de la invención

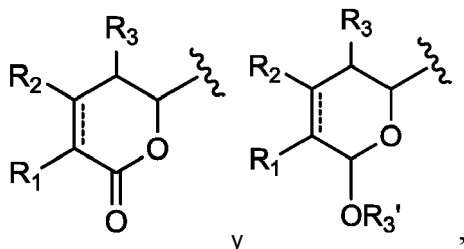
Existe la necesidad de conjugados de fármaco activos novedosos que no se basen en las familias de fármacos citotóxicos que se han usado como cargas útiles hasta ahora. La presente invención aborda esta necesidad. Además, se proporcionan adicionalmente compuestos de unión a fármacos novedosos para su uso en la preparación de conjugados de fármaco de la presente invención, composiciones farmacéuticas que contienen dichos conjugados de fármaco y su uso como antineoplásicos.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado de fármaco que comprende un resto de fármaco unido covalentemente al resto del conjugado de fármaco, teniendo el compuesto una fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab, en la que D es un resto de fármaco seleccionado de las fórmulas (Ia) y (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo:



en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión grupo L;

5 A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

10 cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se selecciona independientemente de hidrógeno,  $OR_a$ ,  $OCOR_a$ ,  $OCOOR_a$ ,  $NR_aR_b$ ,  $NR_aCOR_b$ ,  $NR_aC(=NR_a)NR_aR_b$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquenoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquinoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

$R_3'$  se selecciona de hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ ,  $CONR_aR_b$ ,  $S(O)R_a$ ,  $SO_2R_a$ ,  $P(O)(R_a)R_b$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquenoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquinoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

15 cada uno de  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  y  $R_{12}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquenoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquinoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

20  $R_{11}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquenoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquinoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, o  $R_{11}$  y  $R_{12}$  junto con el átomo de N y átomo de C correspondiente al que se unen pueden formar un grupo heterocíclico, insaturado o saturado, sustituido o no sustituido, de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y opcionalmente que comprende uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre en dicho(s) anillo(s) además del átomo de nitrógeno del  $NR_{11}$ , en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

25  $R_{13}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquenoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alquinoilo  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquenoilo  $C_4-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alqueniilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido y alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

5 R<sub>18</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y grupos heterocíclicos, insaturados o saturados, sustituidos o no sustituidos, de 5 a 14 miembros que tienen uno o más anillos, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido y halógeno;

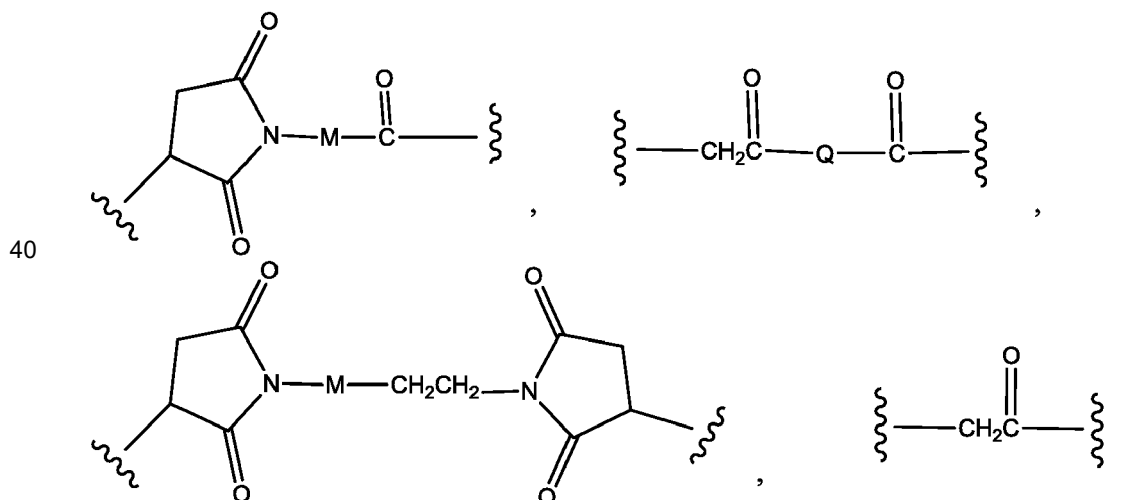
10 cada uno de R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alqueniilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituidos o no sustituidos que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos y grupos heterocíclicos, insaturados o saturados, sustituidos o no sustituidos, de 5 a 14 miembros que tienen uno o más anillos, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

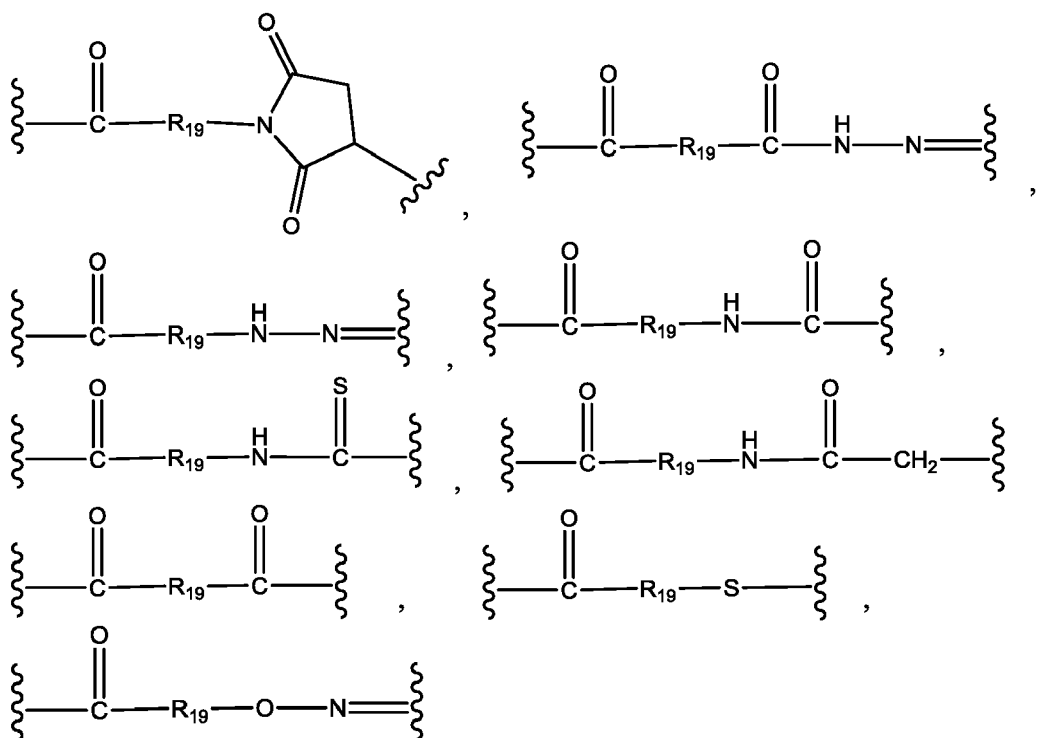
15 los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, grupos alqueniilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, grupos alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, átomos de halógeno, grupos oxo, grupos tio, grupos ciano, grupos nitro, OR<sub>y</sub>, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, S(O)R<sub>y</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, P(O)(R<sub>y</sub>)OR<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>C(=O)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>C(=NR<sub>y</sub>)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>,  
 20 grupos arilo que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes que pueden ser el mismo o diferentes seleccionados del grupo que consiste en R<sub>y</sub>, OR<sub>y</sub>, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>C(=NR<sub>y</sub>)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, grupos aralquilo que comprenden un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono sustituidos con un grupo arilo opcionalmente sustituido tal como se definió anteriormente, grupos aralquilo que comprenden un grupo alcoxilo que tiene desde 1 hasta 12  
 25 átomos de carbono sustituidos con un grupo arilo opcionalmente sustituido tal como se definió anteriormente, y un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>y</sub>, y en los que existe más de un sustituyente opcional en cualquier grupo dado, pudiendo ser los sustituyentes opcionales R<sub>y</sub> el mismo o diferentes;

30 cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituyen con al menos un átomo de halógeno, grupos aralquilo que comprenden un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituye con un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos y grupos heterocicloalquilo que comprenden un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituye con un grupo heterocíclico, insaturado o saturado, de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un  
 35 átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s);

y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.

L es un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en:





5

en las que

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

10 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>- en los que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)R- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)R-, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

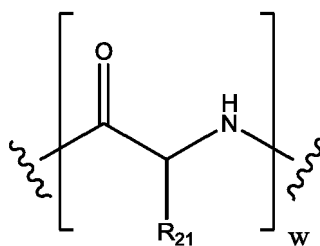
25 M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-CON(H o alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, fenileno-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- en el que el resto de fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> y -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-CON(H o alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-;

Q se selecciona del grupo que consiste en -N(H o alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-fenileno- y -N(H o alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>;

30 r es un número entero que oscila entre 1 y 10; y

s es un número entero que oscila entre 1 y 10;

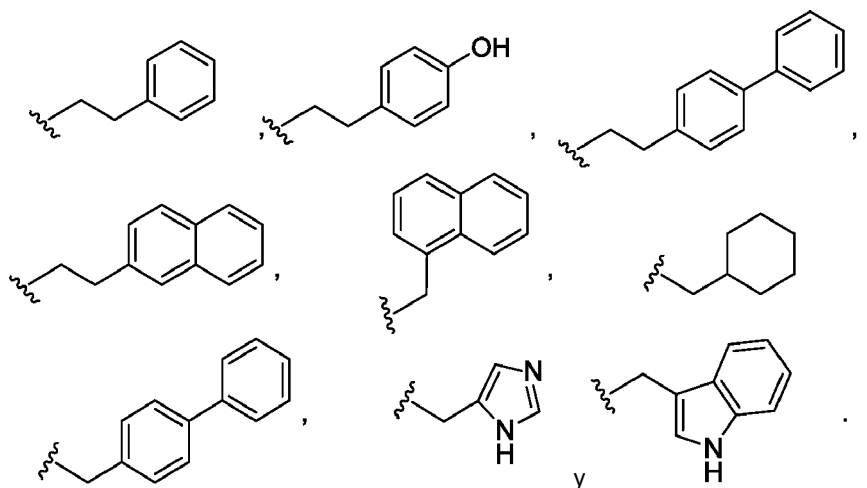
(AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II):



(II)

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

- 5 R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



10

y w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en:

- CONH-(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-;
- 15 - COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
- CONH-(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
- CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
- COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-;
- 20 - COCH<sub>2</sub>NH-;
- CONH-(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
- CONH-(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
- (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
- (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
- 25 - (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-; y
- (alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-.

b es un número entero de 0 ó 1;

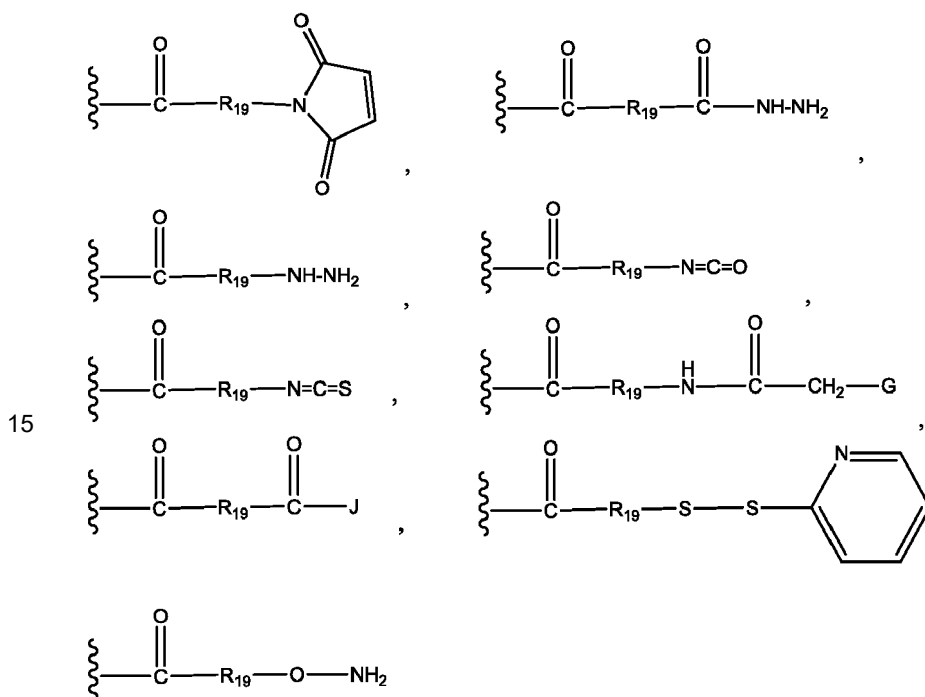
Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 20.

5 Tal como se explicará y ejemplificará en mayor detalle a continuación, los conjugados de fármaco de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab de la presente invención representan un avance en abordar los problemas explicados resumidamente antes de requerir más conjugados de fármaco además de los basados en las tres familias principales de fármacos citotóxicos que se han usado como cargas útiles hasta ahora, que muestran una actividad antitumoral excelente.

10 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de unión seleccionado del grupo de fórmulas que consiste en:



en las que cada una de las líneas onduladas indica el punto de unión covalente a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

G se selecciona de halógeno, -O-mesilo y -O-tosilo;

20 J se selecciona de halógeno, hidroxilo, -N-succinimidoxilo, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo, -O-tetrafluorofenilo y -O-C(O)-OR<sub>20</sub>;

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, en el que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;



R<sub>20</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

r es un número entero que oscila entre 1-10; y

cada uno de D, X, AA y w es tal como se define en el primer aspecto de la invención.

- 5 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la invención, para su uso como medicamento.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento de cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma y cáncer de ovario. Los cánceres más preferidos se seleccionan de cáncer colorrectal, cáncer de mama, leucemia, linfoma y cáncer de ovario.

10

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

### Descripción detallada de realizaciones preferidas

15 En los compuestos de la presente invención, los grupos alquilo en las definiciones de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>3'</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>18'</sub>, R<sub>20</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub>, R<sub>26</sub>, R<sub>27</sub>, R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>x</sub>, R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> pueden ser grupos de cadena alquílica ramificada o cadena lineal que tienen desde 1 hasta 12 átomos de carbono, y son preferiblemente un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo *is*-propilo, y lo más preferiblemente un grupo metilo. En las definiciones de M y Q, pueden ser grupos de cadena alquílica ramificada o cadena lineal que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

20

En los compuestos de la presente invención, los grupos alqueno en las definiciones de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>3'</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>18'</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub>, R<sub>26</sub>, R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> y R<sub>x</sub> son ramificados o no ramificados, y pueden tener uno o más dobles enlaces y desde 2 hasta 12 átomos de carbono. Preferiblemente, tienen desde 2 hasta 6 átomos de carbono, y más preferiblemente son grupos alqueno ramificados o no ramificados que tienen 2, 3 ó 4 átomos de carbono.

25

En los compuestos de la presente invención, los grupos alquino en las definiciones de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>3'</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>12</sub>, R<sub>13</sub>, R<sub>14</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>18'</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub>, R<sub>26</sub>, R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> y R<sub>x</sub> son ramificados o no ramificados, y pueden tener uno o más triples enlaces y desde 2 hasta 12 átomos de carbono. Preferiblemente, tienen desde 2 hasta 6 átomos de carbono, y más preferiblemente son grupos alquino ramificados o no ramificados que tienen 2, 3 ó 4 átomos de carbono.

30

En los compuestos de la presente invención, los grupos alqueno en las definiciones de R<sub>13</sub> y R<sub>14</sub> son ramificados o no ramificados, y pueden tener uno o más dobles enlaces y uno o más triples enlaces. Preferiblemente, tienen desde 4 hasta 12 átomos de carbono, y más preferiblemente son grupos alqueno ramificados o no ramificados que tienen desde 6 hasta 10 átomos de carbono.

35 En los compuestos de la presente invención, los sustituyentes halógenos en las definiciones de R<sub>27</sub>, R<sub>x</sub>, R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> incluyen F, Cl, Br y I, preferiblemente Cl.

En los compuestos de la presente invención, los grupos heterocíclicos saturados o insaturados de 5 a 14 miembros en las definiciones de R<sub>x</sub>, R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub>, R<sub>18</sub> y los grupos heterocíclicos que pueden formarse por R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> junto con el átomo de nitrógeno y el átomo de carbono a los que se unen, son grupos heterocíclicos que tienen uno o más anillos, que comprenden al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s). Los grupos heterocíclicos son grupos que pueden ser grupos heteroaromáticos o grupos heteroalíclicos, de los cuales los últimos pueden ser parcialmente insaturados, conteniendo los grupos heterocíclicos tanto aromáticos como alicíclicos desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados. Preferiblemente, los grupos heteroaromáticos y heteroalíclicos contienen desde 5 hasta 10 átomos de anillo. Los grupos heteroaromáticos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de átomos de N, O S e incluyen, por ejemplo, quinolino incluyendo 8-quinolino, isoquinolino, cumarino incluyendo 8-cumarino, piridilo, pirazinilo, pirazolilo, pirimidinilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, oxazolilo, imidazolilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, indolizino, ftalazino, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, piridazino, triazinilo, cinolinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzofurazano, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridilo. Los grupos heteroalíclicos adecuados en los compuestos de la presente invención contienen uno, dos o tres heteroátomos seleccionados de átomos de N, O S e incluyen, por ejemplo, pirrolidinilo, tetrahydrofuranilo, dihydrofuranilo, tetrahydrotieno, tetrahydrotiopirano, piperidilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tioxano, piperazinilo, azetidino, oxetano, tiano, homopiperidilo, oxepano, tiepanilo, oxazepino, diazepino, tiazepino, 1,2,3,6-tetrahydropiridilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-pirano, 4H-pirano, dioxano, 1,3-dioxolano, pirazolinilo, ditiano, ditiolano, dihydropirano, dihydrotieno, dihydrofuranilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexilo, 3-

40

45

50

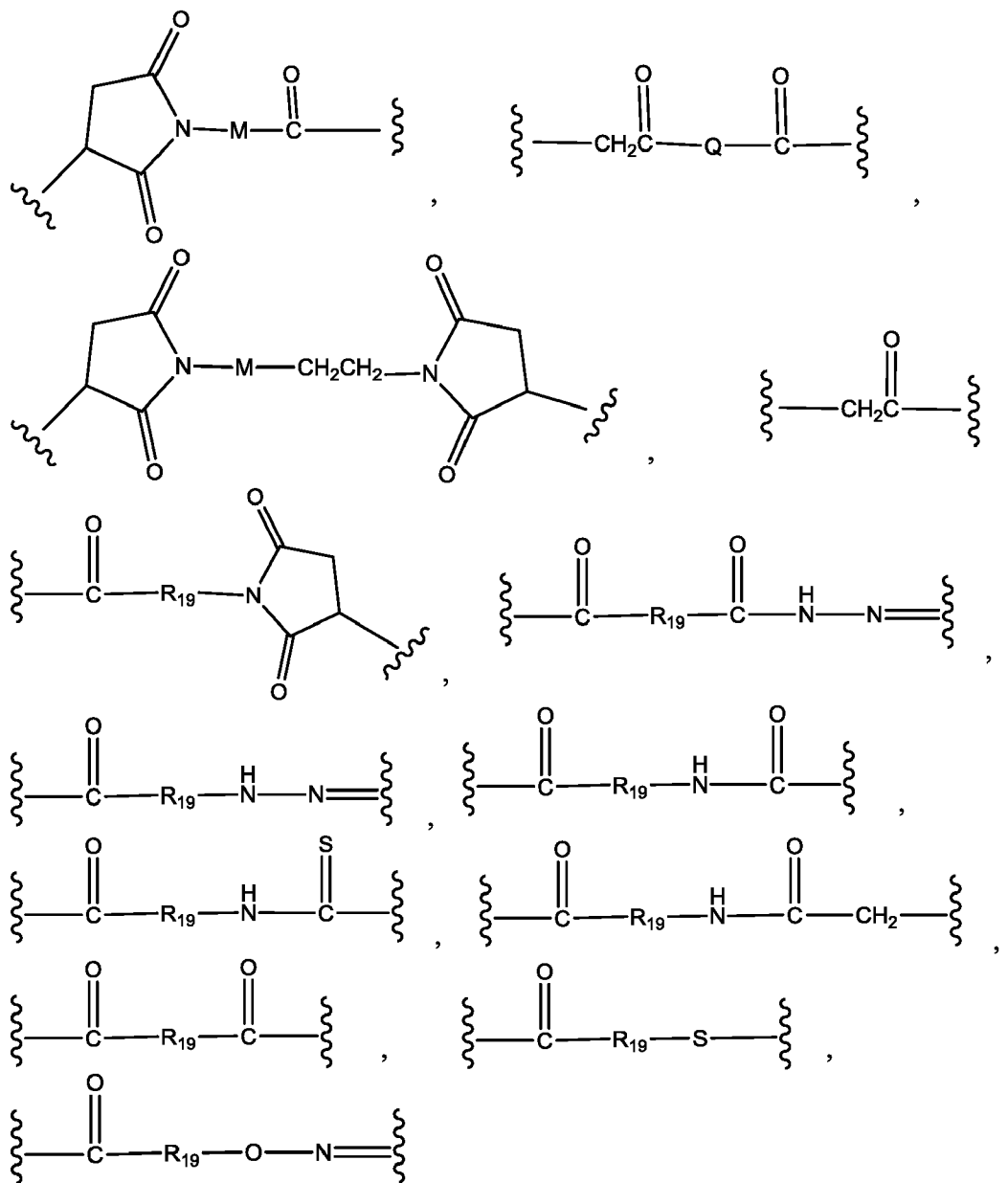
55

azabicyclo[4.1.0]heptilo, 3H-indolilo y quinolizinilo.

- En los compuestos de la presente invención, los grupos arilo en las definiciones de  $R_{18}$ ,  $R_{20}$ ,  $R_a$ ,  $R_b$ , y  $R_x$ , son compuestos de anillos sencillos o múltiples que contienen grupos arilo separados y/o condensados y tienen desde 6 hasta 18 átomos de anillo y se sustituyen opcionalmente. Los grupos arilo típicos contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados. Preferiblemente, los grupos arilo contienen desde 6 hasta 12 átomos de anillo de carbono. Los grupos arilo particularmente preferidos incluyen fenilo sustituido o no sustituido, naftilo sustituido o no sustituido, bifenilo sustituido o no sustituido, fenantrilo sustituido o no sustituido y antrilo sustituido o no sustituido, y el más preferido fenilo sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes son tal como se indicó anteriormente dependiendo de si el grupo arilo es uno de los sustituyentes  $R_{20}$ ,  $R_{28}$ ,  $R_a$  y  $R_b$  o es el sustituyente  $R_x$ .
- En los compuestos de la presente invención, los grupos aralquilo en las definiciones de  $R_x$ ,  $R_y$  y  $R_z$  comprenden un grupo alquilo tal como se definió y ejemplificó anteriormente que se sustituye con uno o más grupos arilo tal como se definió y ejemplificó anteriormente. Los ejemplos preferidos incluyen bencilo opcionalmente sustituido, feniletilo opcionalmente sustituido y naftilmetilo opcionalmente sustituido.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos aralquiloxilo en las definiciones de  $R_x$  comprenden un grupo alcoxilo que tiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono que se sustituye con uno o más grupos arilo tal como se definió y ejemplificó anteriormente. Preferiblemente, el resto alcoxílico tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono y el grupo arilo contiene desde 6 hasta aproximadamente 12 átomos de anillo de carbono, y lo más preferiblemente el grupo aralquiloxilo es benciloxilo opcionalmente sustituido, feniletóxilo opcionalmente sustituido y naftilmetóxilo opcionalmente sustituido.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos heterocicloalquilo en las definiciones de  $R_y$  y  $R_z$  comprenden un grupo alquilo tal como se definió y ejemplificó anteriormente que se sustituye con uno o más grupos heterociclilo tal como se definió y ejemplificó anteriormente. Preferiblemente, los grupos heterocicloalquilo comprenden un grupo alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono que se sustituye con un grupo heterociclilo que tiene desde 5 hasta 10 átomos de anillo en 1 ó 2 átomos de anillo y puede ser aromático, parcialmente saturado o totalmente saturado. Más preferiblemente, los grupos heterocicloalquilo comprenden un grupo metilo o etilo que se sustituye con un grupo heterociclilo seleccionado del grupo que consiste en pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tetrahidrofurano, oxanilo, tianilo, 8-quinolilo, isoquinolilo, piridilo, pirazinilo, pirazolilo, pirimidinilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, oxazolilo y bencimidazol.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos alquileo en la definición de  $R_{19}$  son grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 1 hasta 12 átomos de carbono y los grupos alquileo en las definiciones de  $M$  y  $X$  son grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono. Preferiblemente, los grupos alquileo en la definición de  $R_{19}$  son grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 1 hasta 8 átomos de carbono, más preferiblemente grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono. Para  $M$ , se prefieren grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 1 hasta 3 átomos de carbono. En la definición de  $X$ , los grupos alquileo en la definición de  $X$  son preferiblemente grupos alquileo lineales o ramificados que tienen desde 2 hasta 4 átomos de carbono.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos carbociclo en las definiciones de  $R_{19}$  y  $M$  son grupos cicloalquilo que tienen desde 3 hasta 8 átomos de carbono que tienen dos enlaces covalentes en cualquier posición en el anillo cicloalquilo que conecta dicho grupo cicloalquilo al residuo del conjugado de fármaco. Preferiblemente, los grupos carbociclo en las definiciones de  $R_{19}$  y  $M$  son grupos cicloalquilo que tienen desde 3 hasta 7 átomos de carbono, y más preferiblemente grupos carbociclo que tienen desde 5 hasta 7 átomos de carbono.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos arileno en la definición de  $R_{19}$  son grupos arilo que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos que tienen dos enlaces covalentes en cualquier posición en el sistema de anillo aromático que conecta dichos grupos arileno al residuo del conjugado de fármaco. Preferiblemente, los grupos arileno en la definición de  $R_{19}$  son grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12 átomos de carbono en uno o más anillos que tienen dos enlaces covalentes en cualquier posición del sistema de anillos aromático, y lo más preferiblemente son grupos fenileno.
- En los compuestos de la presente invención, los grupos heterociclo en la definición de  $R_{19}$  son grupos heterociclilo que contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados que tienen desde 5 hasta 14 átomos de anillo y que comprenden al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), en los que hay dos enlaces covalentes en cualquier posición en el sistema de anillos de dichos grupos heterocíclicos. Los grupos heterocíclicos son grupos que pueden ser grupos heteroaromáticos o grupos heteroalíclicos (los últimos pueden ser parcialmente insaturados). Preferiblemente, los grupos heterociclo en la definición de  $R_{19}$  son grupos heterociclilo que contienen desde 1 hasta 3 anillos separados o condensados que tienen desde 5 hasta 12 átomos de anillo y que comprenden al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), en los que existen dos enlaces covalentes en cualquier posición en el sistema de anillos de dichos grupos heterocíclicos.
- Cuando hay más de un sustituyente opcional  $R_x$  en un sustituyente, cada sustituyente  $R_x$  puede ser el mismo o diferente.

Los conjugados de fármaco preferidos según el primer aspecto de la presente invención incluyen:

• un conjugado de fármaco de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, en el que L es un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en:



en las que

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

15  $R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_{12}$ -, -carbociclo  $C_3-C_8$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_{12}$ )-, -arileno  $C_6-C_{18}$  en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -arileno  $C_6-C_{18}$  en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-C_{18}$ -alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-, -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-alquileo  $C_1-C_{12}$ -, -heterociclo  $C_5-C_{14}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -(heterociclo  $C_5-C_{14}$ )- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -(heterociclo  $C_5-C_{14}$ )-alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo

20

puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ ,  $-(OCH_2CH_2)_r$  y  $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r$ , en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

5

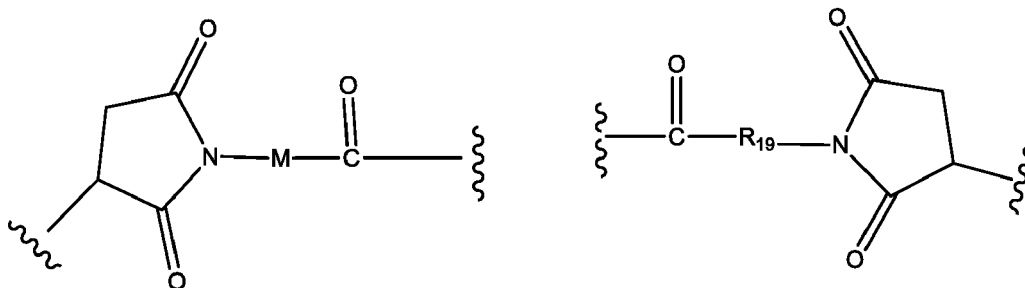
M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo  $C_1-C_6$ -, -alquileo  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-,  $-(CH_2CH_2O)_s$ -, -alquileo  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-CON(H o alquil  $C_{1-6}$ )-alquileo  $C_1-C_6$ -, fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , fenileno-alquileo  $C_1-C_6$ - en el que el resto de fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  y -alquileo  $C_1-C_6$ -CON(H o alquil  $C_{1-6}$ )-alquileo  $C_1-C_6$ -;

10 Q se selecciona del grupo que consiste en -N(H o alquil  $C_{1-6}$ )fenileno- y -N(H o alquil  $C_{1-6}$ )-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>;

r es un número entero que oscila entre 1 y 10; y

s es un número entero que oscila entre 1 y 10.

• un conjugado de fármaco de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, en el que L se selecciona del grupo que consiste en:



15

en las que:

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

20

$R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_{12}$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_{12}$ )-, -arileno  $C_6-C_{12}$  en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -arileno  $C_6-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-C_{12}$ -alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -heterociclo  $C_5-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -(heterociclo  $C_5-C_{12}$ )- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -(heterociclo  $C_5-C_{12}$ )-alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ ,  $-(OCH_2CH_2)R$ - y  $-CH_2-(OCH_2CH_2)R$ - en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ; y

25

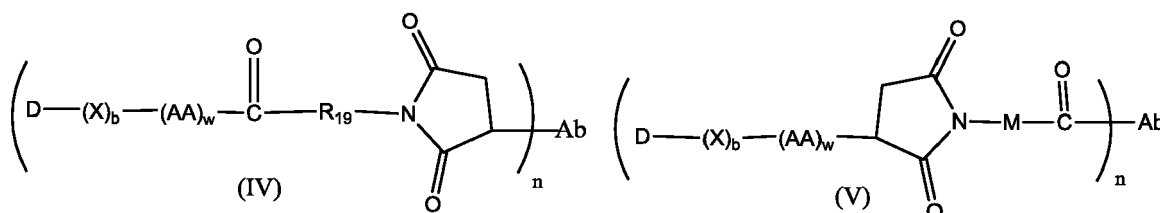
30

35

M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo  $C_1-C_6$ -, -alquileo  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )- y fenileno que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ; y

r es un número entero que oscila entre 1-6.

• un conjugado de fármaco de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):



en las que:

X es un grupo de extensión tal como se define en el primer aspecto de la invención;

cada AA es independientemente una unidad de aminoácido tal como se define en el primer aspecto de la invención;

w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

5 b es un número entero de 0 ó 1;

D es un resto de fármaco;

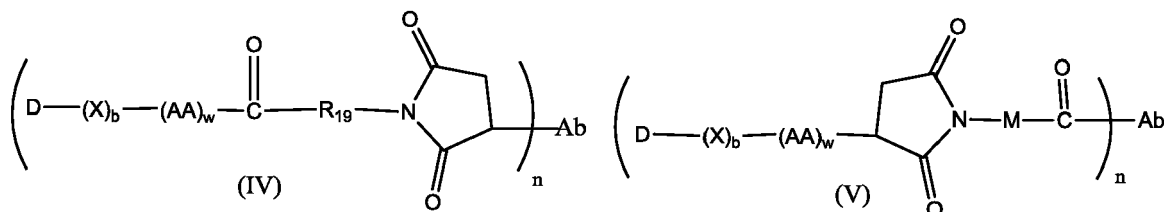
Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno;

n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en la fórmula (IV) o (V) con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 20;

10  $R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_8$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_8$ )-, -alquileo  $C_1-C_8$ -arileno  $C_6-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-C_{12}$ -alquileo  $C_1-C_8$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ; y

15 M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo  $C_1-C_3$ - y -alquileo  $C_1-C_3$ -(carbociclo  $C_5-C_7$ )-.

• un conjugado de fármaco de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):



en las que:

20 X es un grupo de extensión;

cada AA es independientemente una unidad de aminoácido;

w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

b es un número entero de 0 ó 1;

D es un resto de fármaco;

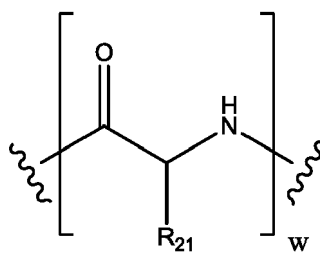
25 Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno;

n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en (IV) o (V) con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 20;

30  $R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_6$ -, fenileno-alquileo  $C_1-C_6$ - en el que el grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto en la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, y preferiblemente  $R_{19}$  es un grupo -alquileo  $C_1-C_6$ ; y

M es -alquileo  $C_1-C_3$ -(carbociclo  $C_5-C_7$ )-.

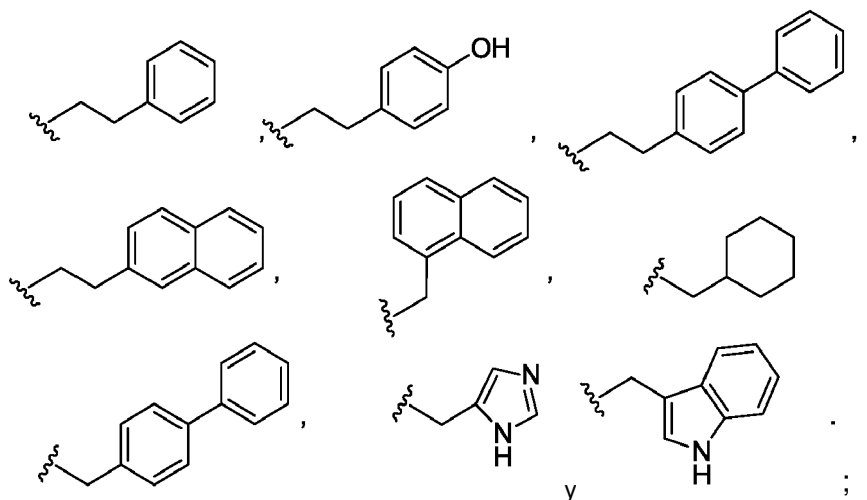
• Se prefiere que en la definición del conjugado de fármaco de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]_n-Ab$ , L sea tal como se define en las definiciones preferidas para dicho grupo anterior y  $(AA)_w$  sea de fórmula (II):



(II)

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

- 5 R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



10

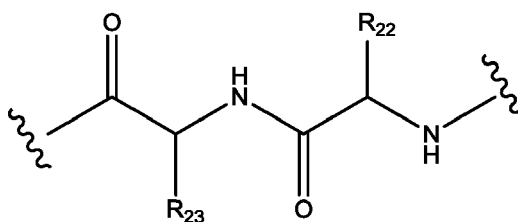
y w es un número entero que oscila entre 0 y 12.

- 15 • un conjugado de fármaco de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, en el que L es tal como se define en las definiciones preferidas para dicho grupo anterior y (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II) en la que:

R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, sec-butilo, bencilo, indolilmetilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>; y

w es un número entero que oscila entre 0 y 6.

- 20 • un conjugado de fármaco de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, en el que L es tal como se define en las definiciones preferidas para dicho grupo anterior, en el que w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III) en la que:



(III)

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

R<sub>22</sub> se selecciona de metilo, bencilo, isopropilo, sec-butilo e indolilmetilo; y

R<sub>23</sub> se selecciona de metilo,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$  y  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC(=NH)NH}_2$ .

• Además, se prefiere que en la definición del conjugado de fármaco de fórmula  $[\text{D}(\text{X})_b(\text{AA})_w(\text{L})_n]\text{-Ab}$ , L y AA sean tal como se definen en las definiciones preferidas para dichos grupos anteriormente y X sea un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en:

- 5
- CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-;
  - COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
  - CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
- 10
- CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;
  - COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-;
  - COCH<sub>2</sub>NH-;
  - CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
  - CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
- 15
- (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
  - (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;
  - (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-; y
  - (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-
- 20
- un conjugado de fármaco de fórmula  $[\text{D}(\text{X})_b(\text{AA})_w(\text{L})_n]\text{-Ab}$  según el primer aspecto de la presente invención, en el que L y AA son tal como se definen en las definiciones preferidas para dichos grupos anteriormente y X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en:
- 25
- CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-;
  - COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano;
- 30
- CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;
  - COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-;
  - CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-;
  - CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-;
  - (alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-;
- 35
- (alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-;
  - (alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-; y
  - (alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-
- 40
- un conjugado de fármaco de fórmula  $[\text{D}(\text{X})_b(\text{AA})_w(\text{L})_n]\text{-Ab}$  según el primer aspecto de la presente invención, en el que L y AA son tal como se definen en las definiciones preferidas para dichos grupos anteriormente y X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en:
  - CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH-;

-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-;

-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>S-;

-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-;

5 -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>S-;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-; y

-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH-

10 • Un conjugado de fármaco preferido de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno.

15 • Otro conjugado de fármaco preferido de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en los que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo.

20 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>3</sub> se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub>, y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente R<sub>3</sub> es hidrógeno.

25 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno, metilo sustituido y no sustituido, isopropilo sustituido y no sustituido y terc-butilo sustituido y no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>.

30 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno.

35 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo.

40 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo.

45 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, AA y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno.

50 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un



estereoisómero del mismo, en el que cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, más preferiblemente cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, y NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub>, en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, aún más preferiblemente cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y lo más preferiblemente cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> es hidrógeno o metilo.

• Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 12 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dicho grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y un grupo heterocíclico insaturado o saturado de 5 a 10 miembros que tiene uno o más anillos, sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, átomos de halógeno, grupos alquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono y grupos dialquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub> y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, y lo más preferiblemente R<sub>18</sub> es hidrógeno o un grupo fenilo, particularmente hidrógeno.

• Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que R<sub>27</sub> se selecciona de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y más preferiblemente R<sub>27</sub> se selecciona de un átomo de hidrógeno y un átomo de cloro.

• Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que cada par de átomos de carbono unidos por una o más líneas discontinuas se unen a través de dobles enlaces.

• Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que:

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en los que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

45 R<sub>3'</sub> se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub>, y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

50 R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

55 hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

- R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 12 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y un grupo heterocíclico insaturado o saturado de 5 a 10 miembros que tiene uno o más anillos, sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, átomos de halógeno, grupos alquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono y grupos dialquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;
- 5 R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>; y
- 10 cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.
- 15 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que:
- R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;
- cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;
- R<sub>3'</sub> es hidrógeno;
- 20 cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno, metilo sustituido o no sustituido, isopropilo sustituido o no sustituido y terc-butilo sustituido o no sustituido en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;
- cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;
- 25 cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en:
- 30 hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.
- 35 R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub> y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>;
- R<sub>27</sub> es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro; y
- 40 cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.
- Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en el que:
- 45 R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;
- cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;
- R<sub>3'</sub> es hidrógeno;
- cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno;
- 50 cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo;
- cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;
- R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo;
- cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en

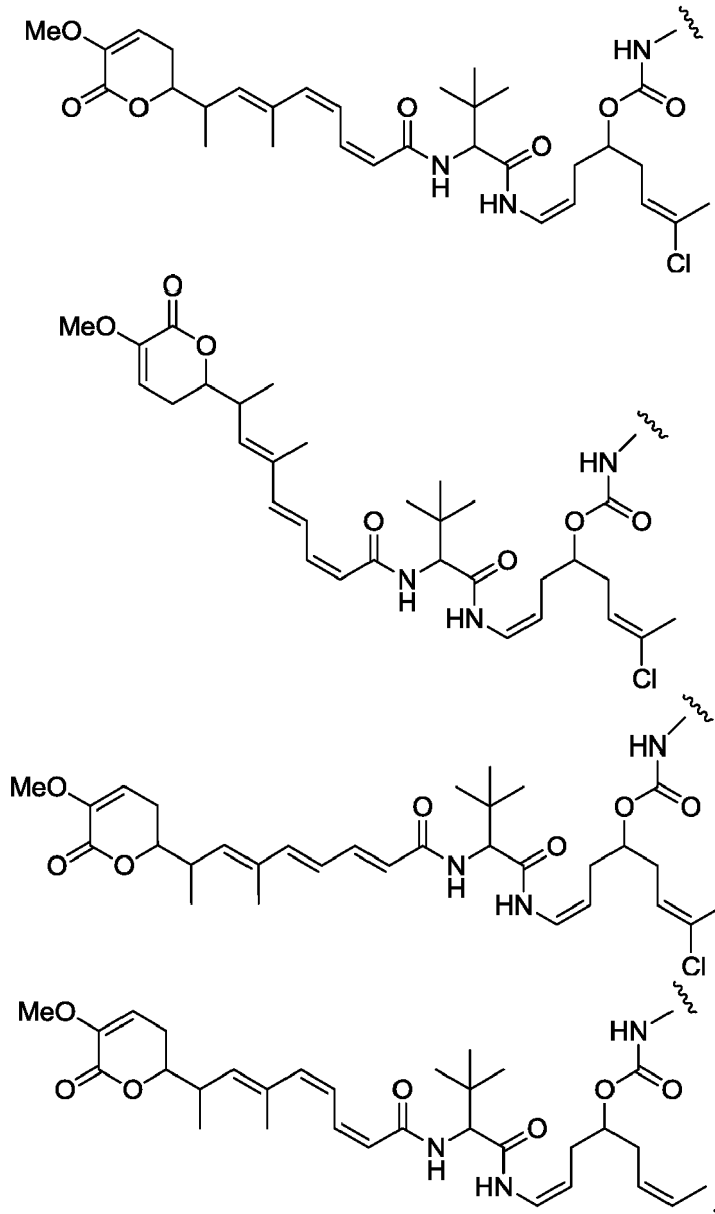
hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente hidrógeno y metilo;

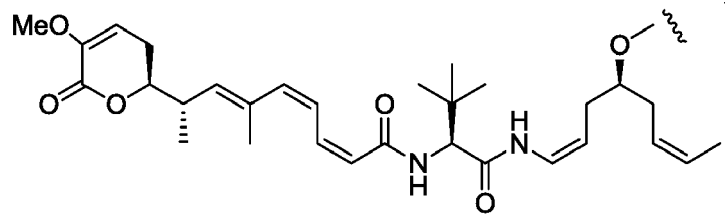
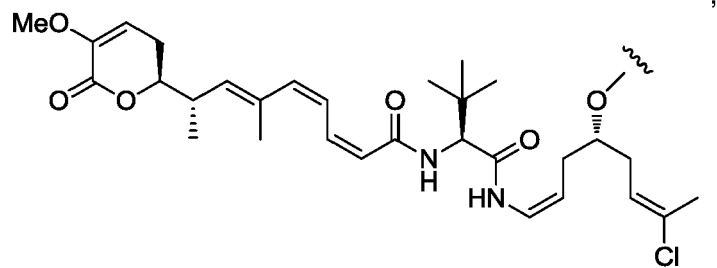
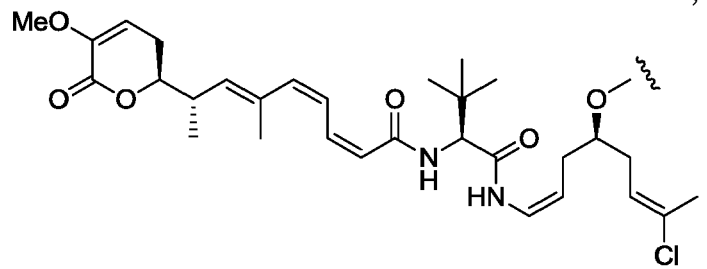
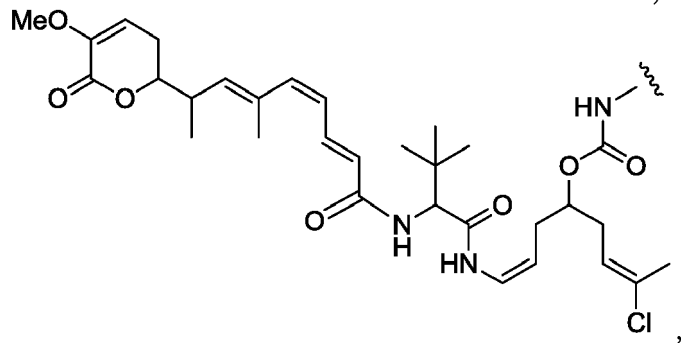
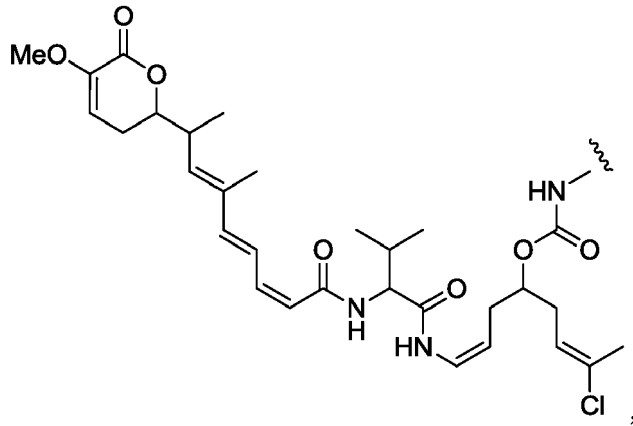
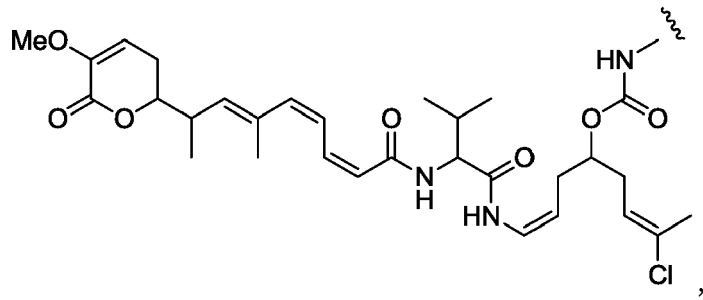
R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno y fenilo, preferiblemente hidrógeno;

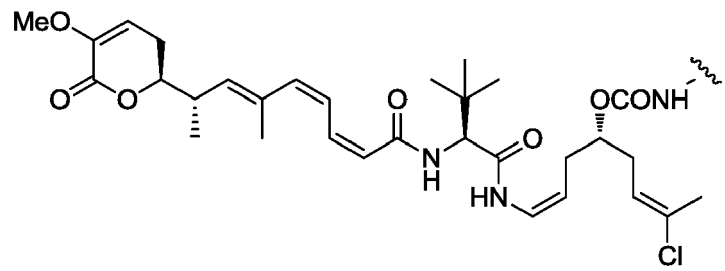
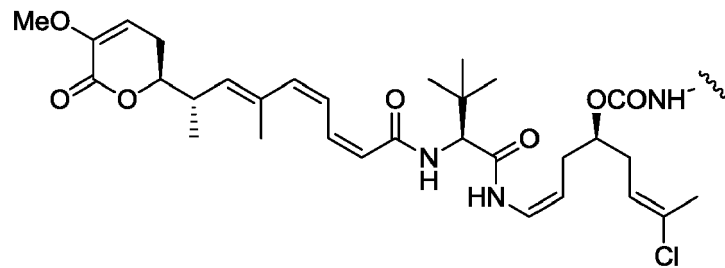
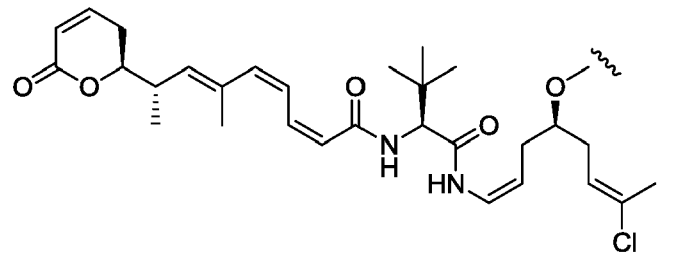
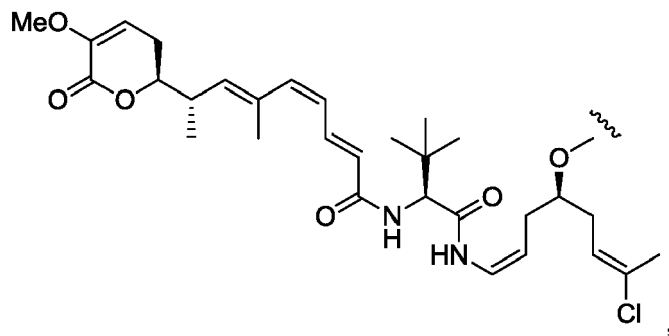
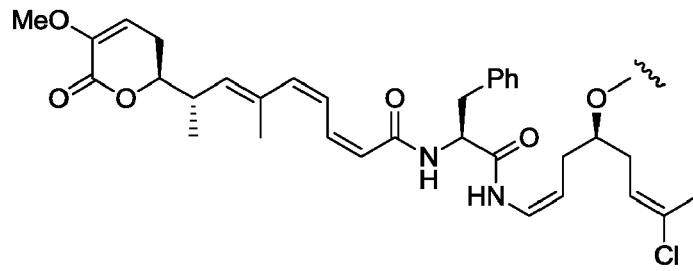
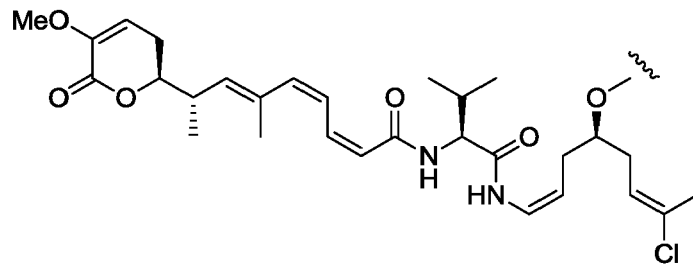
R<sub>27</sub> es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro; y

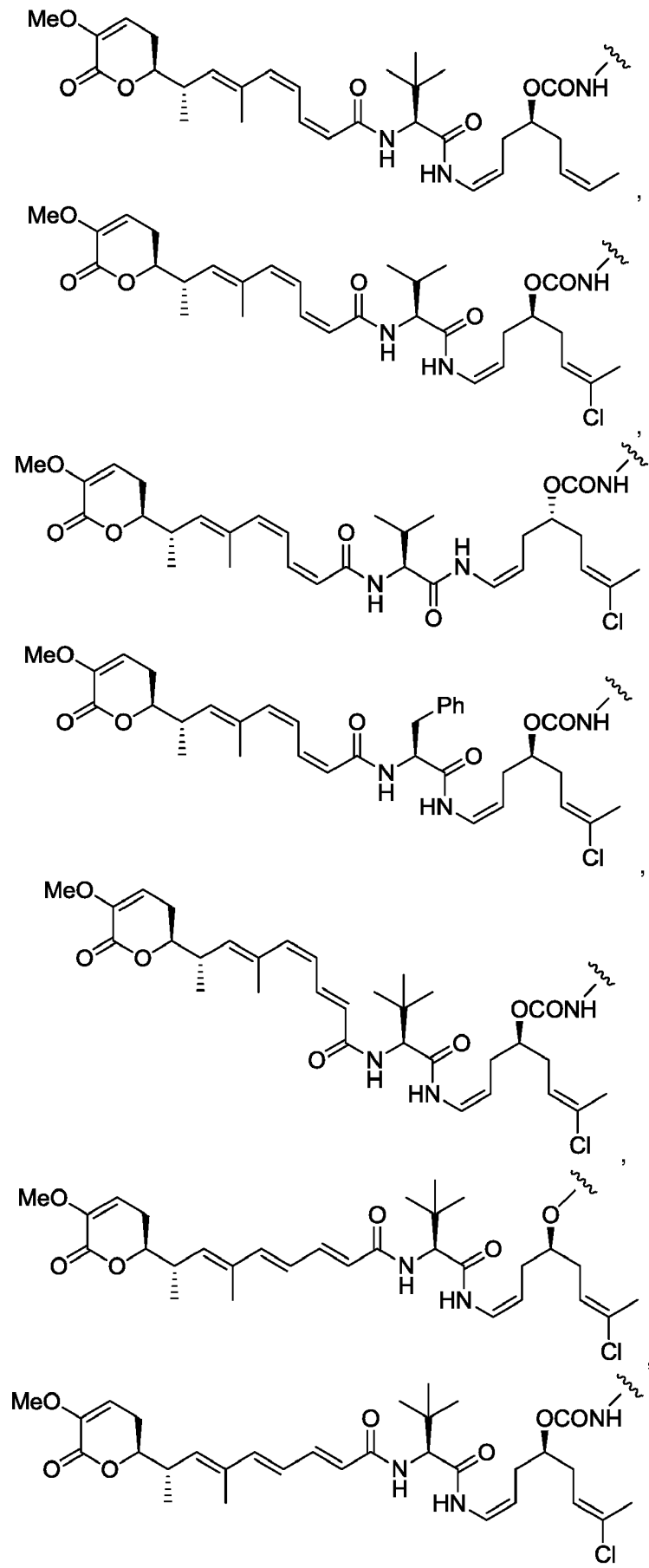
cada par de átomos de carbono unido por una o más líneas discontinuas se une a través de dobles enlaces.

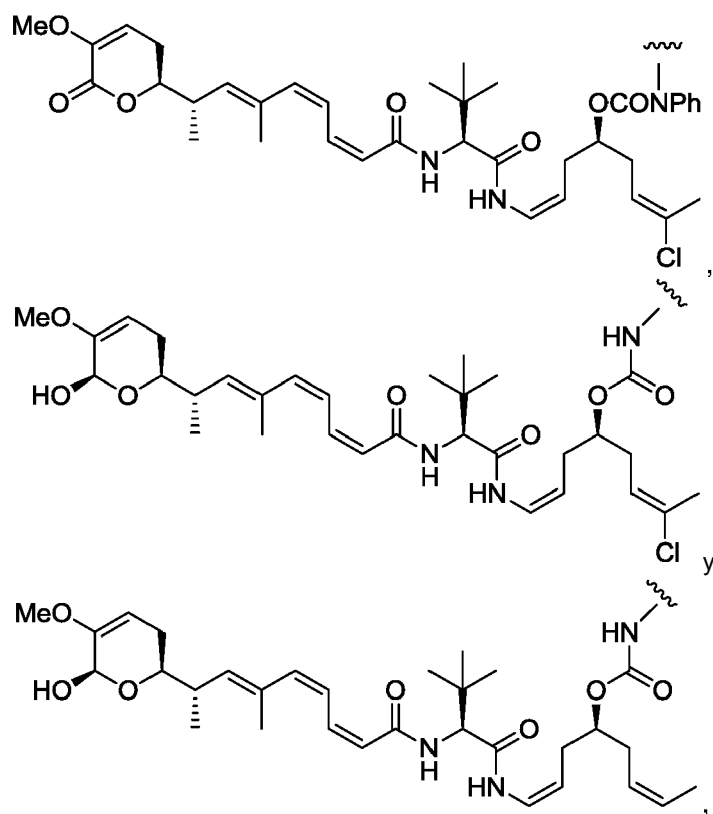
- 5 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L, (AA)<sub>w</sub> y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:





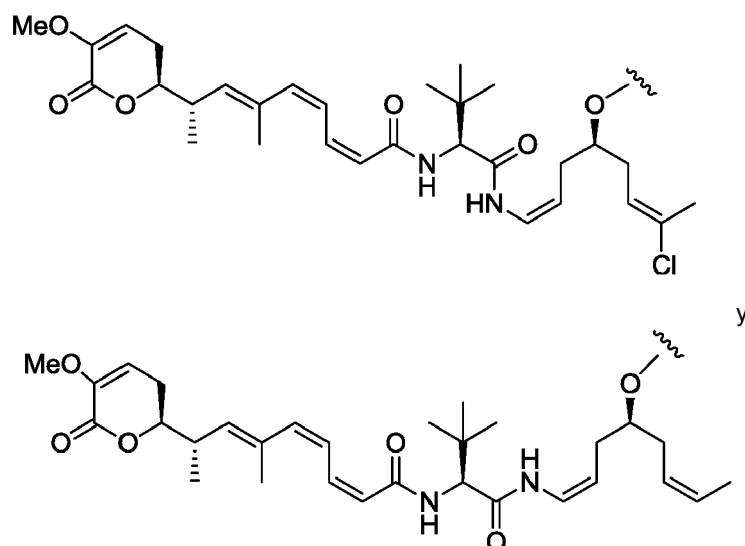






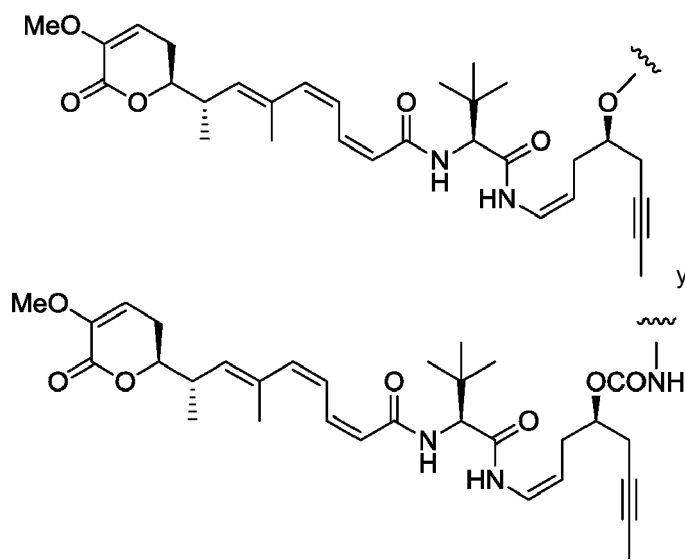
5 en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L.

• Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$  y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:



10 en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L.

15 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$  y X son tal como se definieron anteriormente y en el que D es un compuesto de fórmula (Ia) o (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:



en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L.

- 5 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un péptido de unión a antígeno.
- 10 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo, un anticuerpo de un solo dominio o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal, policlonal o anticuerpo biespecífico y en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se deriva de cualquier especie, preferiblemente un ser humano, un ratón o un conejo.
- 20 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo glicosilado y un fragmento de unión a antígeno glicosilado.
- 25 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento  $F(ab')_2$  y un fragmento Fv.
- 30 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales, antígenos de células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con enfermedad autoinmunitaria, antígenos microbianos y, preferiblemente, un anticuerpo monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas.
- 35 • Un conjugado de fármaco preferido adicional de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, es uno en el que L,  $(AA)_w$ , X y D son tal como se definieron anteriormente y el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, glembatumumab, gemtuzumab, ibritumomab, inotuzumab, labetuzumab, lorvotuzumab, milatuzumab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pinatuzumab, rituximab, vorsetuzumab, trastuzumab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5
- 40

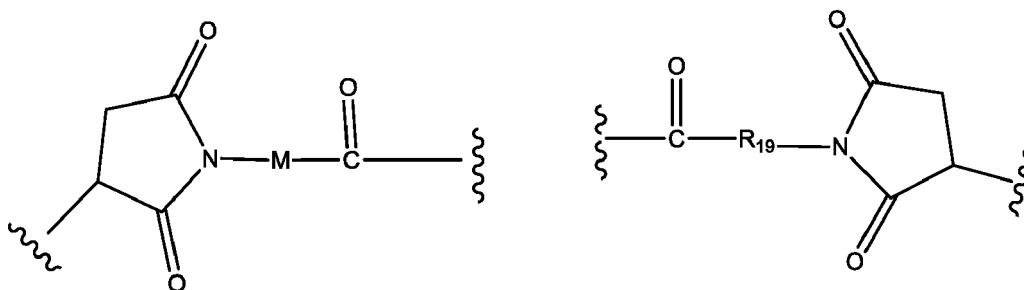


y un anticuerpo anti-CD13, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, en el que preferiblemente el anticuerpo se selecciona de abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, glematumumab, gemtuzumab, ibritumomab, inotuzumab, labetuzumab, lorvotuzumab, milatuzumab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pinatuzumab, rituximab, vorsetuzumab, trastuzumab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y aún más preferiblemente abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, gemtuzumab, ibritumomab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, rituximab y trastuzumab, o una porción inmunológicamente activa de los mismos. De estos, son particularmente preferidos trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; o el anticuerpo se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, particularmente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, particularmente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo.

• Los conjugados de fármaco particularmente preferidos de fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$  según el primer aspecto de la presente invención, incluyen los siguientes:

(a) un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, en el que:

L se selecciona del grupo que consiste en:



y

en las que:

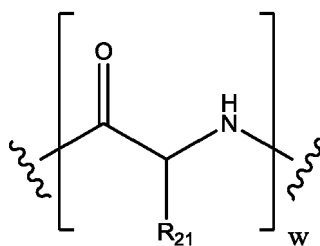
las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

$R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_{12}$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_{12}$ ), -arileno  $C_6-C_{12}$  en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -arileno  $C_6-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-C_{12}$ -alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -heterociclo  $C_5-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ - (heterociclo  $C_5-C_{12}$ -) en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -(heterociclo  $C_5-C_{12}$ )-alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ ,  $-(OCH_2CH_2)_r-$  y  $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r-$ , en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo  $C_1-C_6$ -, -alquileo  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ -) y fenileno que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

r es un número entero que oscila entre 1-6;

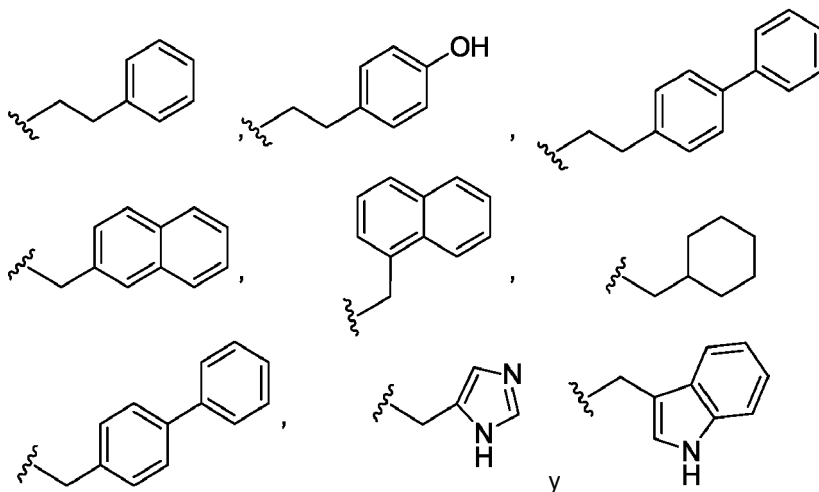
$(AA)_w$  es de fórmula (II):



(II)

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

- 5 R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



10

w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

- 15 en el que X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCOO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;

- 20 D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en los que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 25 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>3</sub> se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub>, y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 30 R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18'</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste

en:

5 hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub>, en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

10 R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 12 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y un grupo heterocíclico insaturado o saturado de 5 a 10 miembros que tiene uno o más anillos, sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, átomos de halógeno, grupos alquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono y grupos dialquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

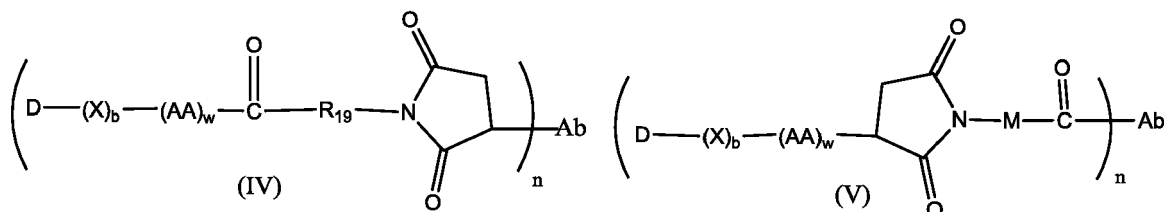
15 R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>;

20 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo glicosilado y un fragmento de unión a antígeno glicosilado; y

25 n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 12.

(b) un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

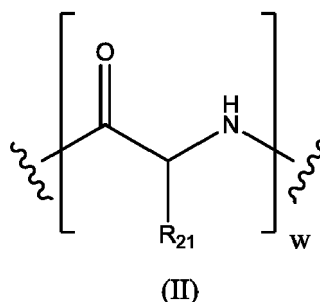


en las que:

30 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> y -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>- y -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-);

(AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II)



en la que:

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

5  $R_{21}$  se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, sec-butilo, bencilo, indolilmetilo,  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ ,  $-(CH_2)_4NH_2$ ,  $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$  y  $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ ;

w es un número entero desde 0 hasta 6;

10 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en  $-\text{CONH}(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}$ -,  $-\text{COOCH}_2\text{-fenileno-NH}$ -, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano,  $-\text{CONH}(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH-COO-CH}_2\text{-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes } R_x \text{ seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH}$ -,  $-\text{COCH}_2\text{NH-COCH}_2\text{-NH}$ -,  $-\text{CONH}(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{S}$ -,  $-\text{CONH}(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NHCO}(\text{alquileo } C_1-C_3)\text{S}$ -,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NHCO}(\text{alquileo } C_1-C_3)\text{S}$ -,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{S}$ -,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}$ - y  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH-COO-CH}_2\text{-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes } R_x \text{ seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH}$ ;

20 D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

$R_1$  es hidrógeno o metoxilo;

cada uno de  $R_2$  y  $R_3$  es hidrógeno;

$R_3'$  es hidrógeno;

25 cada uno de  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  y  $R_{12}$  se selecciona independientemente de hidrógeno, metilo sustituido y no sustituido, isopropilo sustituido y no sustituido y terc-butilo sustituido y no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

cada uno de  $R_{11}$  y  $R_{13}$  es hidrógeno;

cada uno de  $R_{15}$ ,  $R_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{17'}$ ,  $R_{18'}$ ,  $R_{24}$ ,  $R_{24'}$ ,  $R_{25}$  y  $R_{26}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

30 hidrógeno y grupos alquilo  $C_1-C_6$  sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno,  $\text{OCOR}_y$ ,  $\text{OCOOR}_y$ ,  $\text{COR}_y$ ,  $\text{COOR}_y$ ,  $\text{OCONR}_y\text{R}_z$ ,  $\text{CONR}_y\text{R}_z$ ,  $\text{NR}_y\text{R}_z$ ,  $\text{NR}_y\text{COR}_z$ , en los que cada uno de  $R_y$  y  $R_z$  se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

35  $R_{18}$  se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo  $C_1-C_6$  que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo  $R_x$  y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

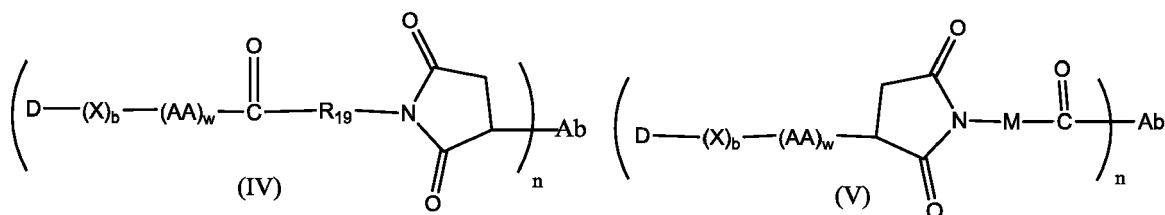
$R_{27}$  es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro;

40 cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une  $R_{25}$  y el átomo de C al que se unen  $R_{26}$  y  $R_{27}$ , entonces están ausentes  $R_{25}$  y o bien  $R_{26}$  o bien  $R_{27}$ ;

45 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal que se une de manera inespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales, antígenos de células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con enfermedad autoinmunitaria, antígenos microbianos y, preferiblemente, un anticuerpo monoclonal que se une de manera inespecífica a antígenos de células cancerosas; y

n es la razón del grupo  $[\text{D}(\text{X})_b(\text{AA})_w(\text{L})]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 3 hasta 8.

(c) un conjugado de fármaco según el primer aspecto, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

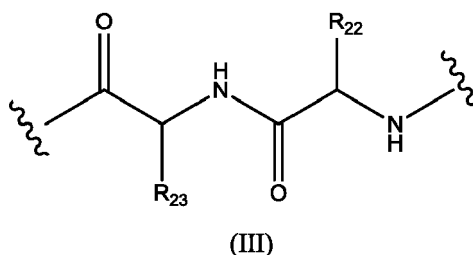


en las que:

5 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, -fenileno-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- en el que el grupo fenileno puede sustituirse  
 opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen  
 desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de  
 10 halógeno, grupos nitro y grupos ciano, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o  
 bien solos o bien unidos a otro resto en la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más  
 sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de  
 carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12  
 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, y preferiblemente R<sub>19</sub> es un grupo alquileo  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



15 en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco  
 (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

R<sub>22</sub> se selecciona de metilo, bencilo, isopropilo, sec-butilo e indolilmetilo;

R<sub>23</sub> se selecciona de metilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>;

20 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-  
 fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro  
 sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de  
 carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos  
 25 ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCOO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta  
 cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos  
 de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro o  
 grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo  
 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-  
 C<sub>4</sub>)NHCOO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub>  
 30 seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos  
 alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato,  
 un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;

cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;

35 R<sub>3'</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo;

cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;

R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo;

Cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente hidrógeno y metilo;

R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno y fenilo, preferiblemente hidrógeno;

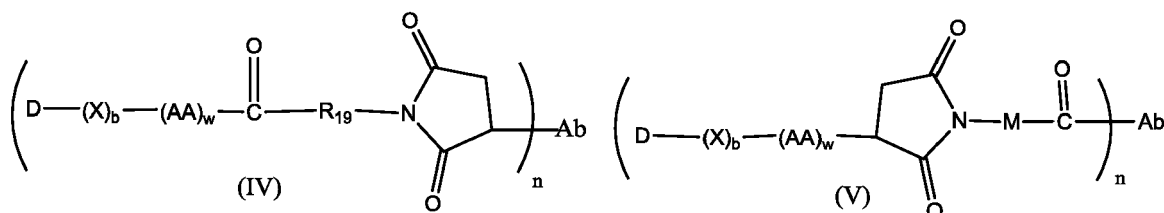
5 R<sub>27</sub> es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro;

cada par de carbonos unidos por una o más líneas discontinuas se une a través de dobles enlaces;

el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, glembatumumab, gemtuzumab, ibritumomab, inotuzumab, labetuzumab, lorvotuzumab, milatuzumab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pinatuzumab, rituximab, vorsetuzumab, trastuzumab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, glembatumumab, gemtuzumab, ibritumomab, inotuzumab, labetuzumab, lorvotuzumab, milatuzumab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pinatuzumab, rituximab, vorsetuzumab, trastuzumab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y aún más preferiblemente abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, gemtuzumab, ibritumomab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, rituximab y trastuzumab, o una porción inmunológicamente activa de los mismos. De estos, son particularmente preferidos un anticuerpo seleccionado de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, más preferiblemente el anticuerpo se selecciona de trastuzumab, un anticuerpo anti-CD13 y anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; o un anticuerpo seleccionado de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, particularmente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

30 (d) un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

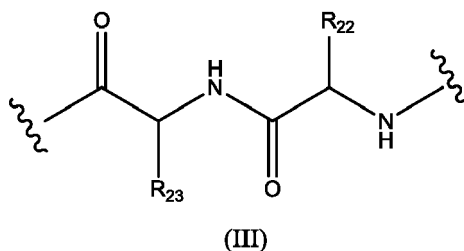


en las que:

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

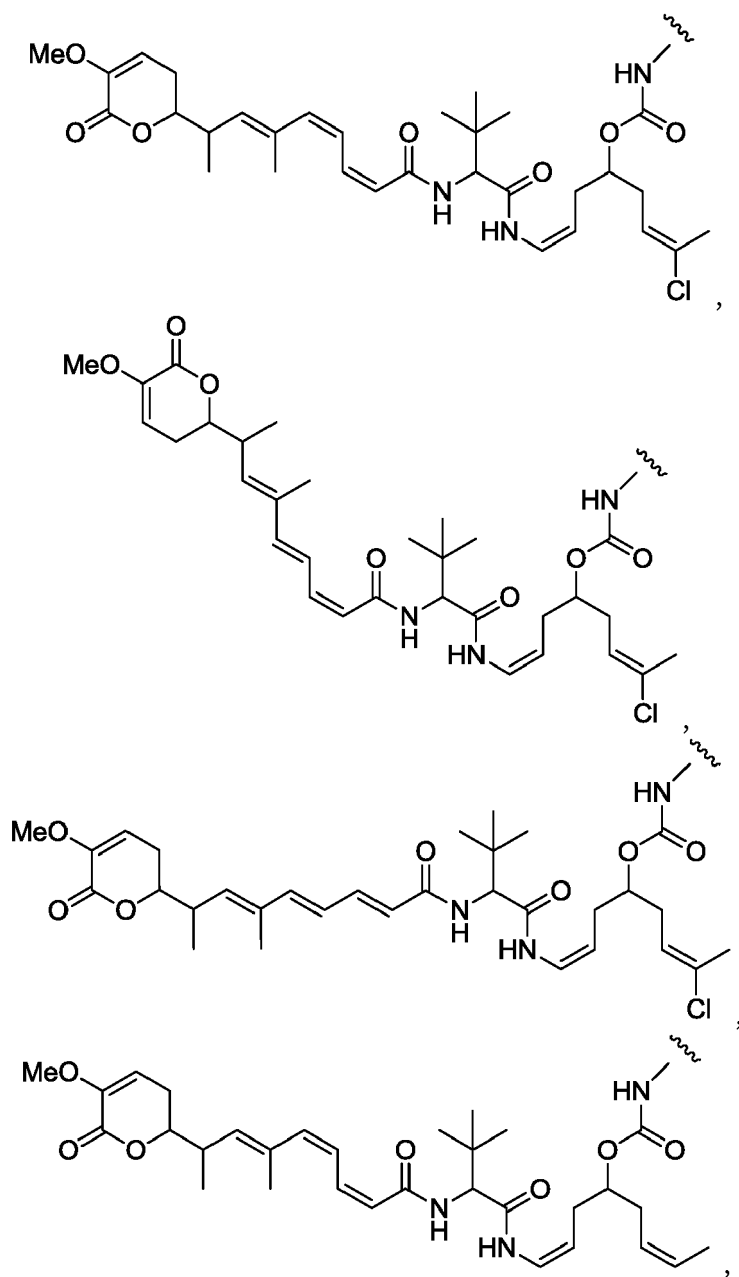
35 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):

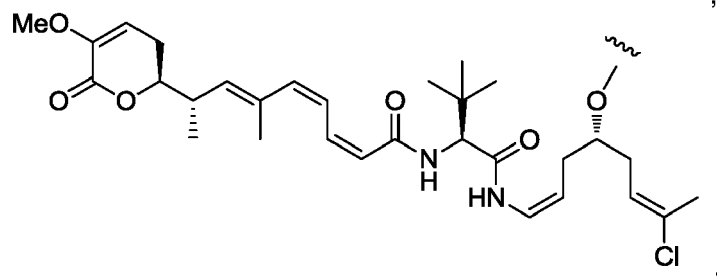
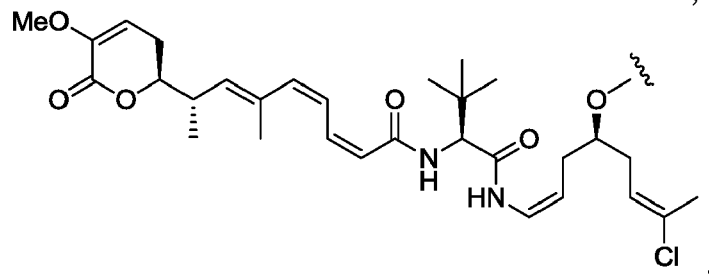
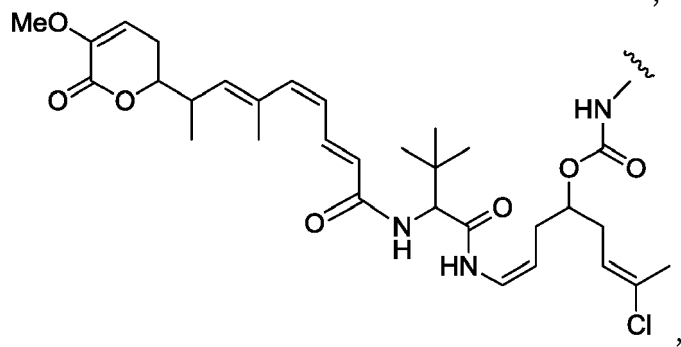
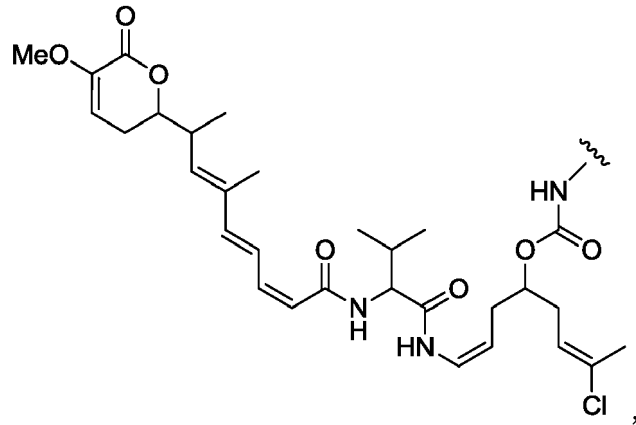
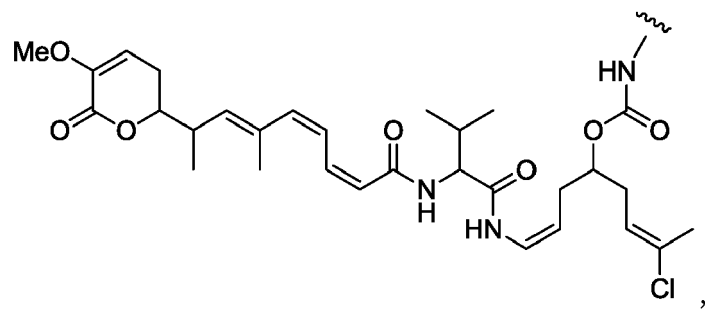


en la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

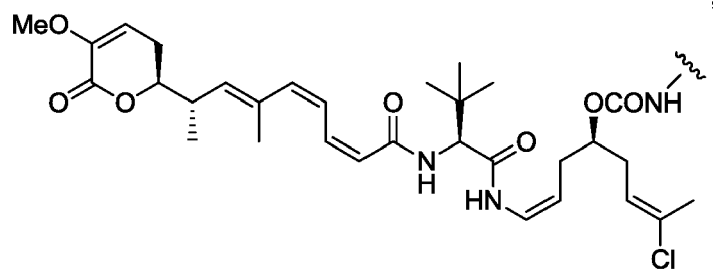
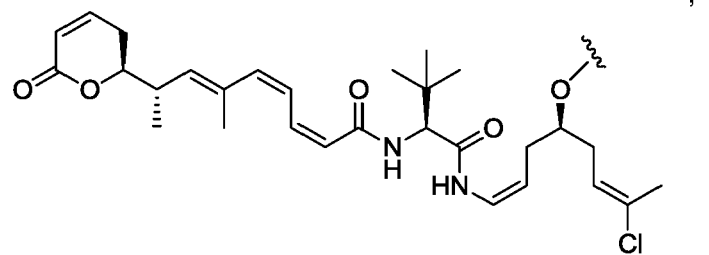
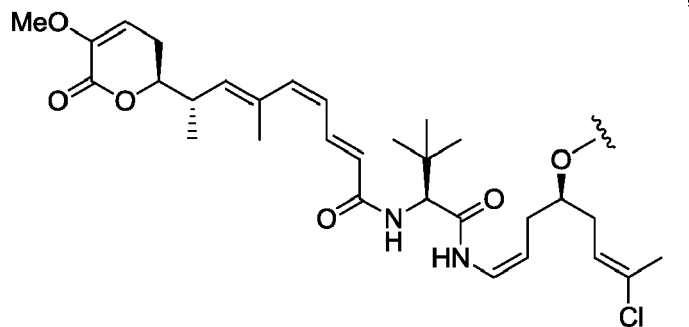
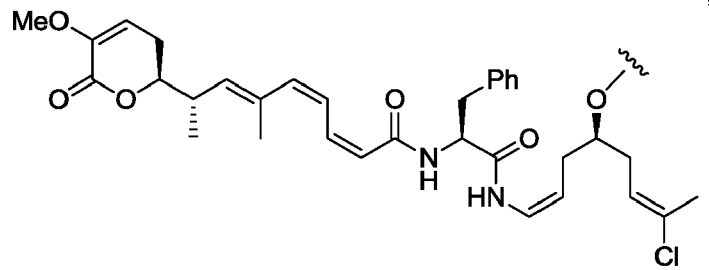
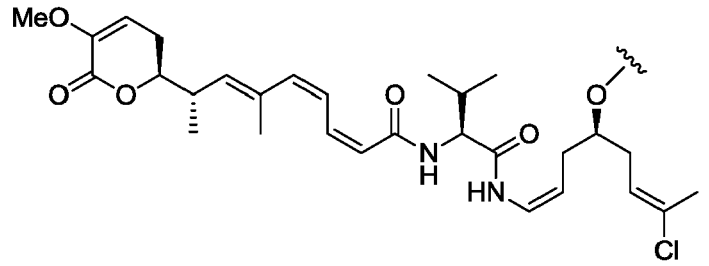
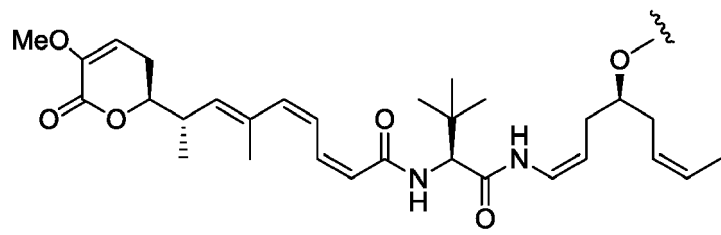
5 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO( alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

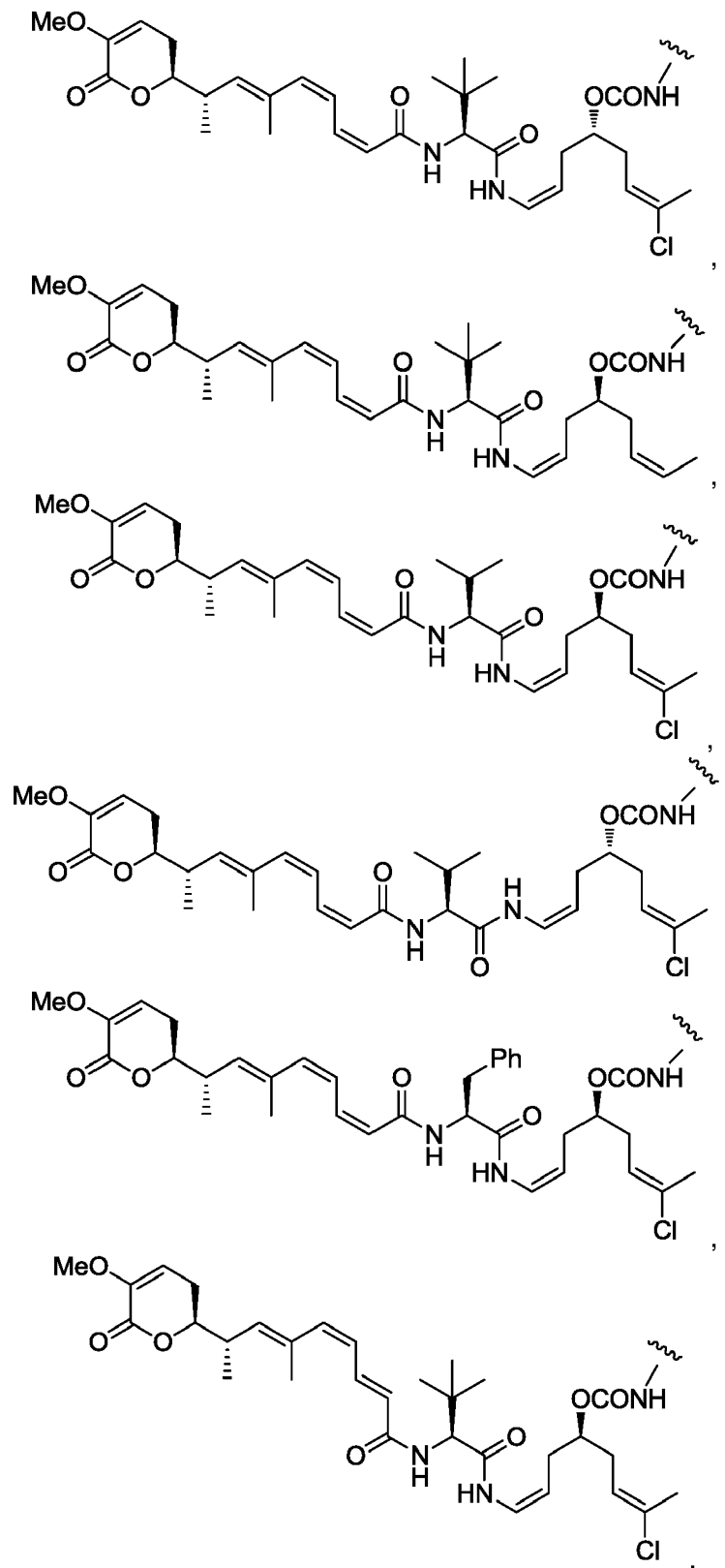
10 D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado del siguiente grupo:

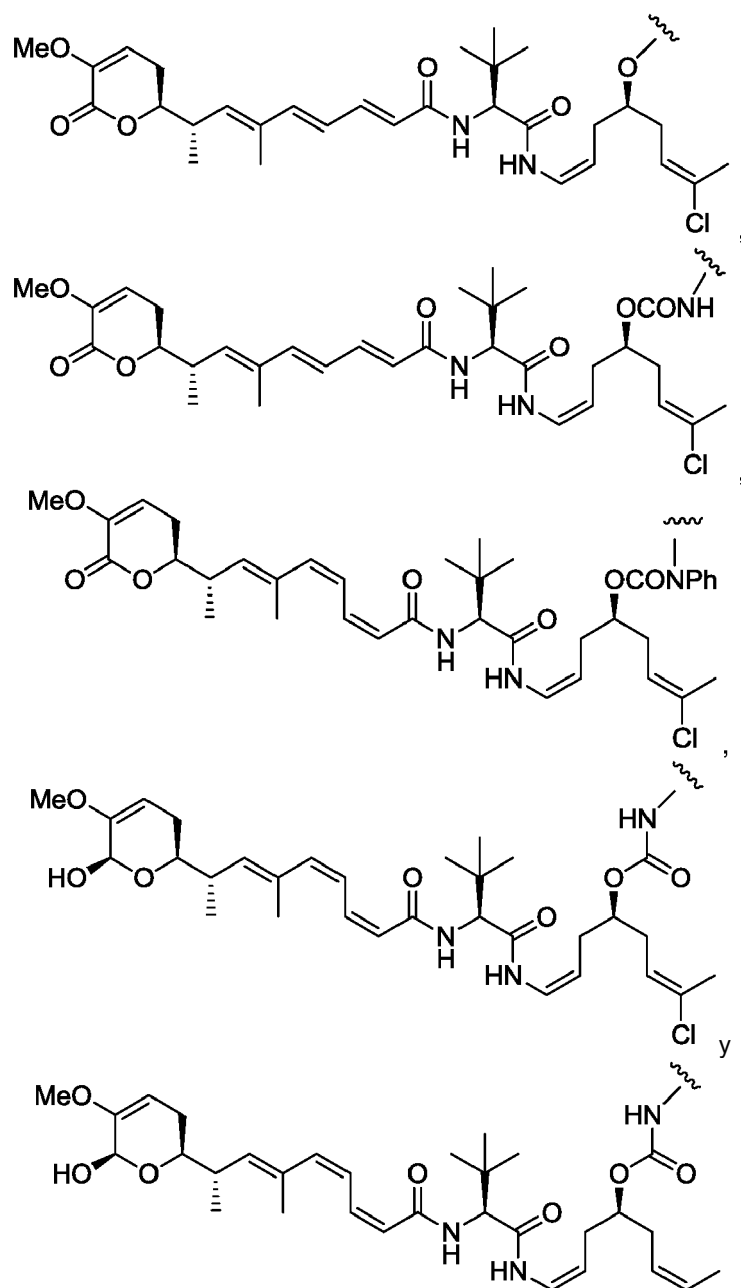












5

en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

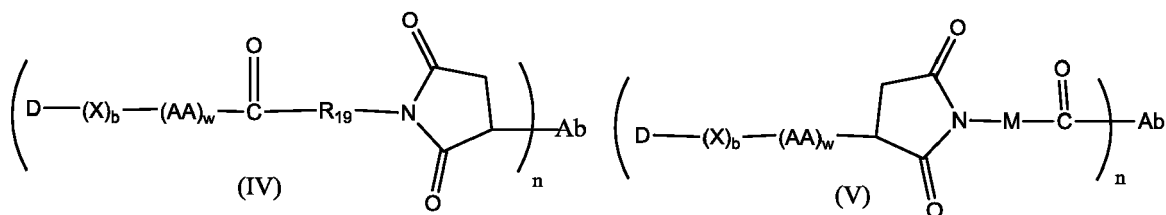
el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y más preferiblemente se selecciona de trastuzumab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o se selecciona de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, particularmente, un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

10

15

n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

(e) Un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

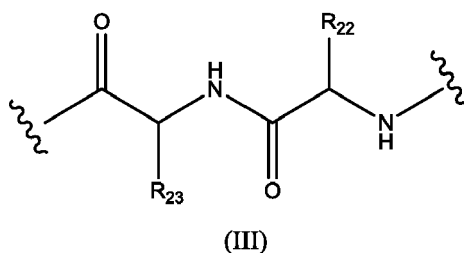


en las que:

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

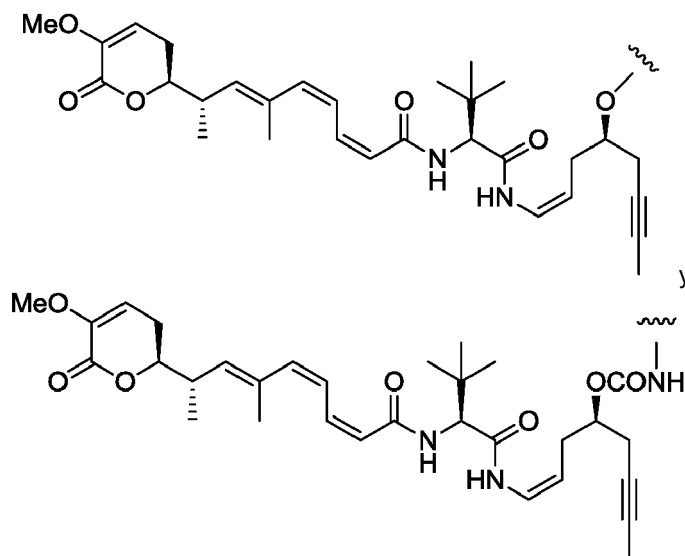
5 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



en la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

- 10 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCOO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:

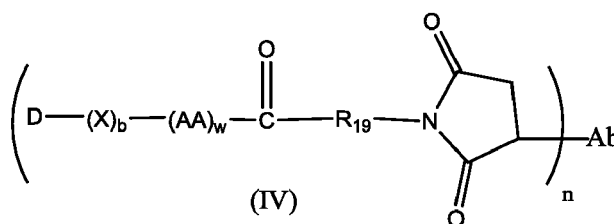


en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

- 5 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; más preferiblemente se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

- 10 (f) Un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, de fórmula (IV):

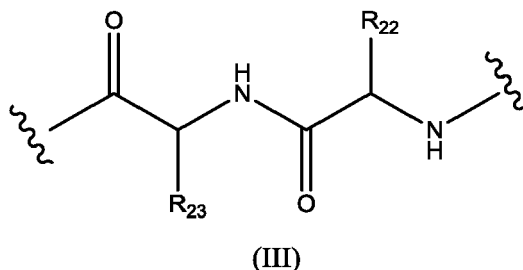


en la que:

$R_{19}$  es alquileo  $C_5$ ;

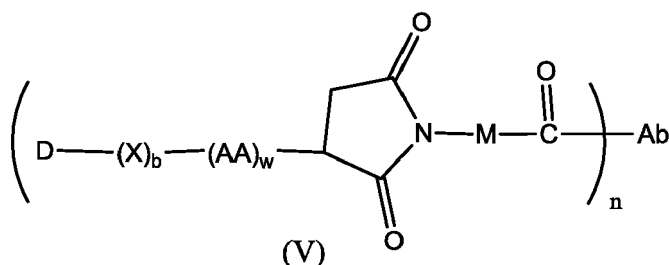
b es 1;

- 15 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces  $(AA)_w$  es de fórmula (III):



en la que  $R_{22}$  es isopropilo,  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ , y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

- 20 X es un grupo de extensión seleccionado de  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOOCH}_2\text{-fenileno-NH-}$  y  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH-}$ ; o de fórmula (V)



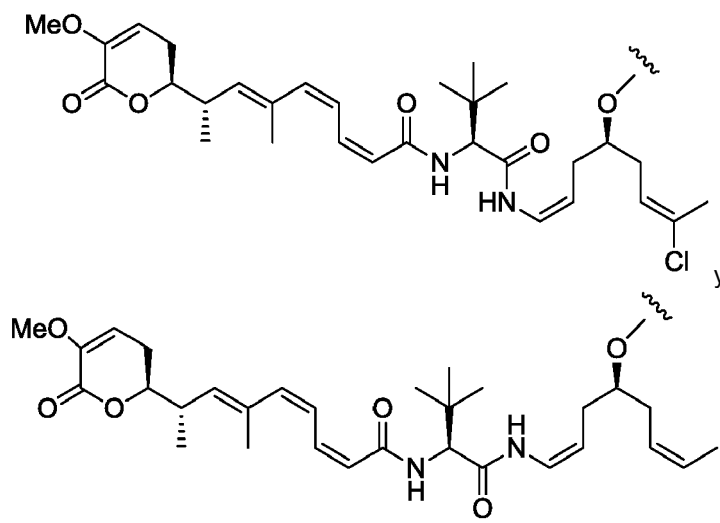
en la que M es  $-\text{metil-ciclohexileno-}$ ;

b es 1;

- 25 w es 0; y

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{S-}$  y  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{S-}$ ;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:

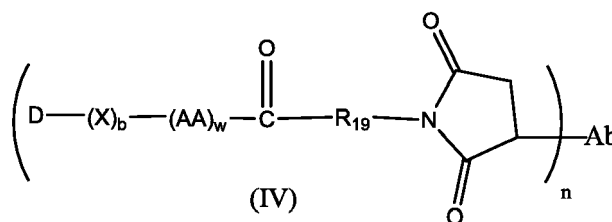


- 5 en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, más preferiblemente se selecciona de trastuzumab, un anticuerpo anti-CD13, un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo anti-CD5, o una porción inmunológicamente activa de los mismos; o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o se selecciona de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente es un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

- 10  
15 n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y preferiblemente 4.

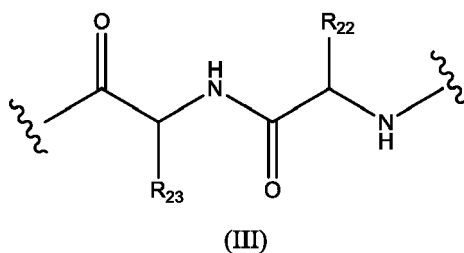
(g) Un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, de fórmula (IV):



- 20 en la que  $R_{19}$  es -alquileo  $C_5$ ;

b es 1;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces  $(AA)_w$  es de fórmula (III):

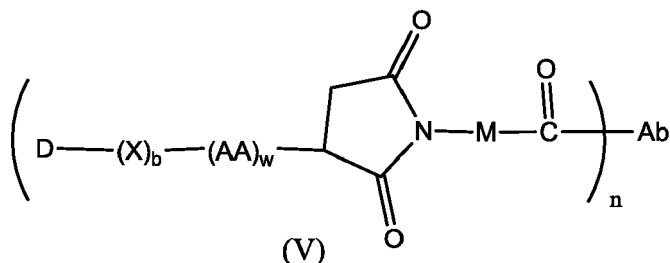


- 25 en la que  $R_{22}$  es isopropilo,  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ , y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada

a la derecha); y

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -fenileno-NH- y  $-(CH_2)_3NH$ ;

o de fórmula (V)



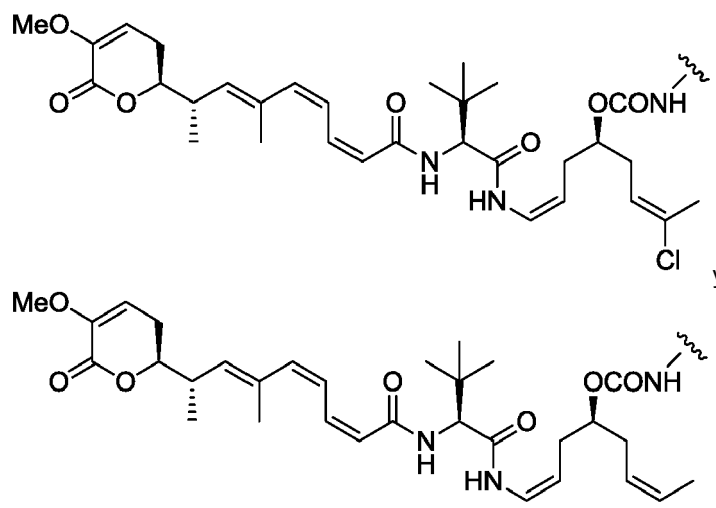
5 en la que M es -metil-ciclohexileno-;

b es 1;

w es 0; y

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-(CH_2)_3S$ - y  $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$ ;

10 D es un resto de fármaco de fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:

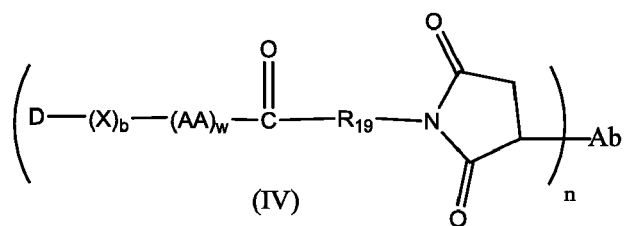


en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

15 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y más preferiblemente se selecciona de trastuzumab, un anticuerpo anti-CD13, un anticuerpo anti-CD4, y un anticuerpo anti-CD5 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y lo más  
20 preferiblemente es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o se selecciona de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, particularmente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y  
25 preferiblemente 4.

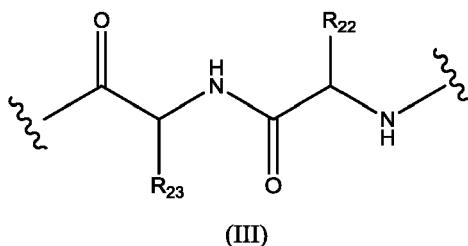
h) Un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, de fórmula (IV):



en la que R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>5</sub>-;

b es 1;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, el (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):

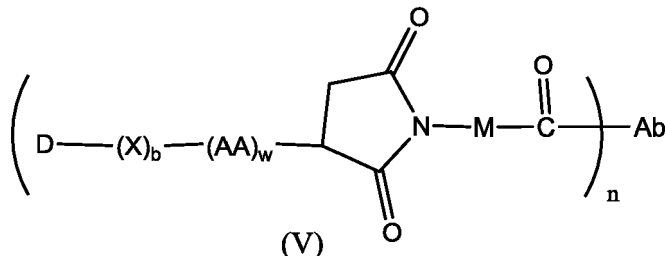


5

En la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

X es un grupo de extensión seleccionado de -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH- y -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-;

10 o de fórmula V)



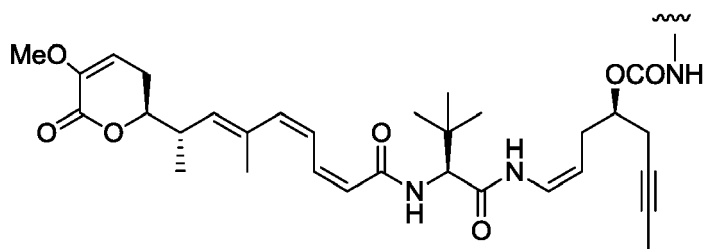
en la que M es -metil-ciclohexileno-;

b es 1;

w es 0; y

15 X es un grupo de extensión seleccionado de -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>S- y -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-:

D es un resto de fármaco de fórmula



20

o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo, en la que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o al grupo de unión L;

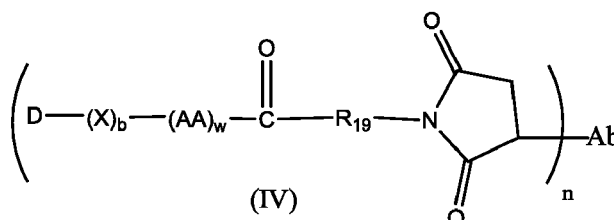
el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de



los mismos, o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y lo más preferiblemente es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

5 n es la razón de los grupos [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] en los que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y preferiblemente 4.

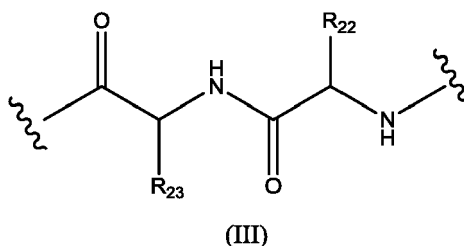
i) Un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención, de fórmula (IV):



en la que R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>5</sub>-;

10 b es 1;

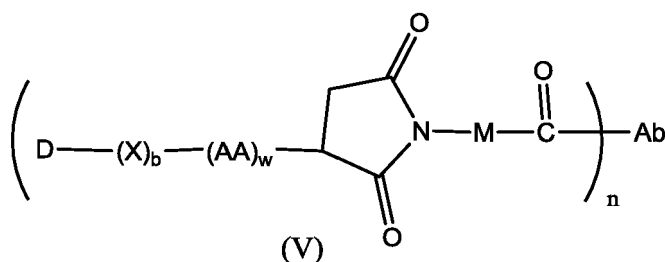
w es 0 ó 2, y cuando w es 2, el (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



15 En la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-;

o de fórmula (V)



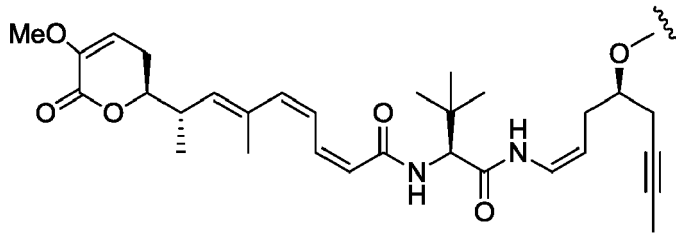
en la que M es -metil-ciclohexileno-;

20 b es 1;

w es 0; y

X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>S- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-;

D es un resto de fármaco de fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo,

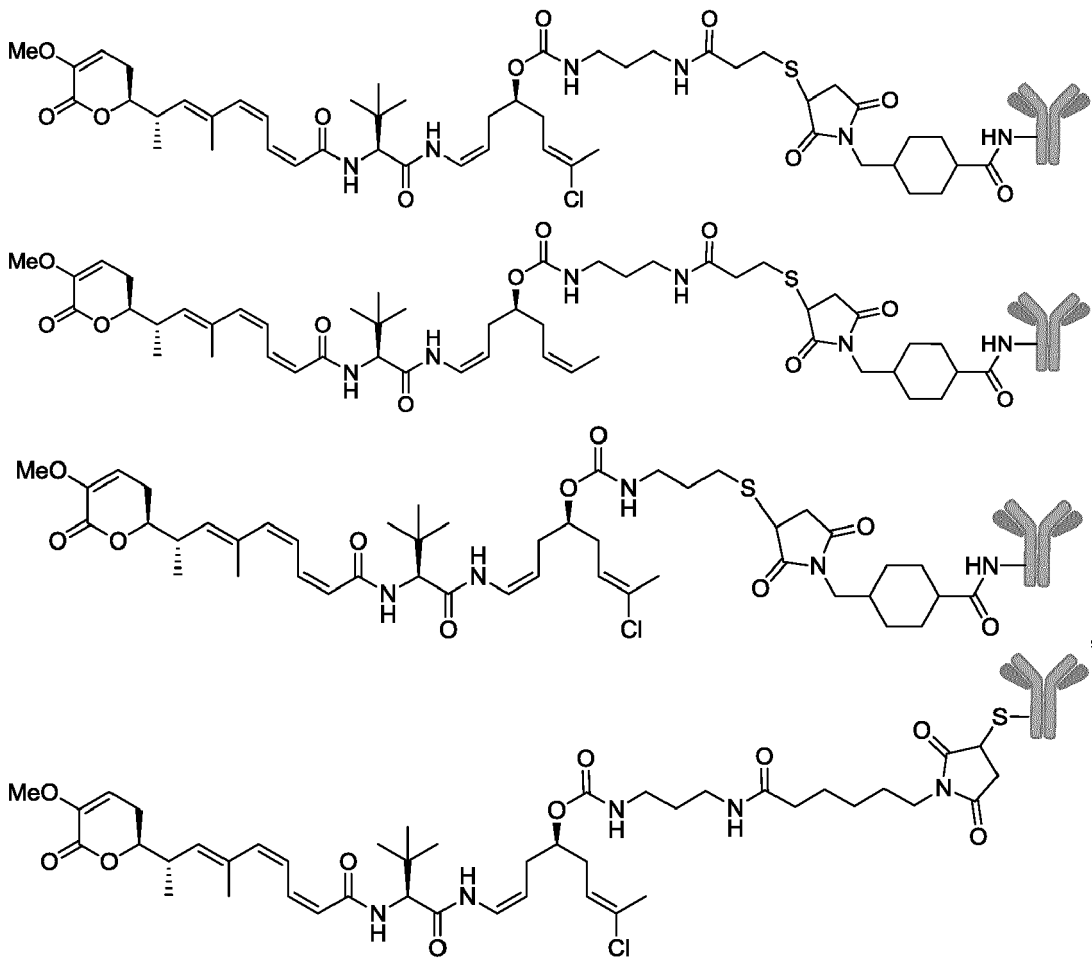
en la que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

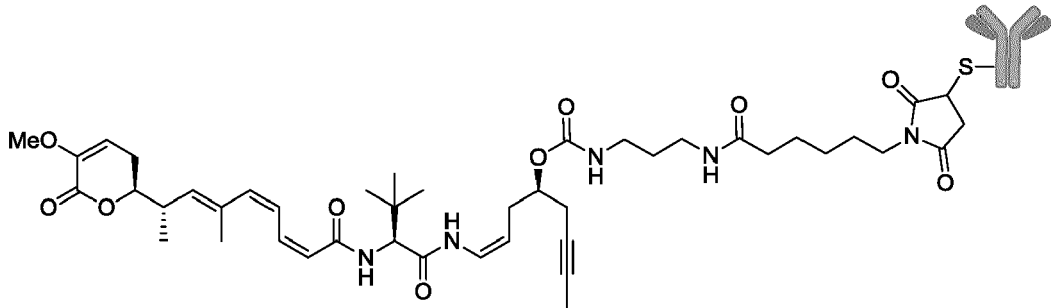
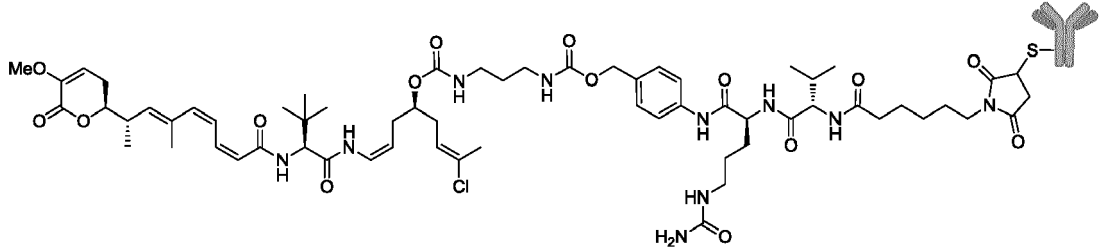
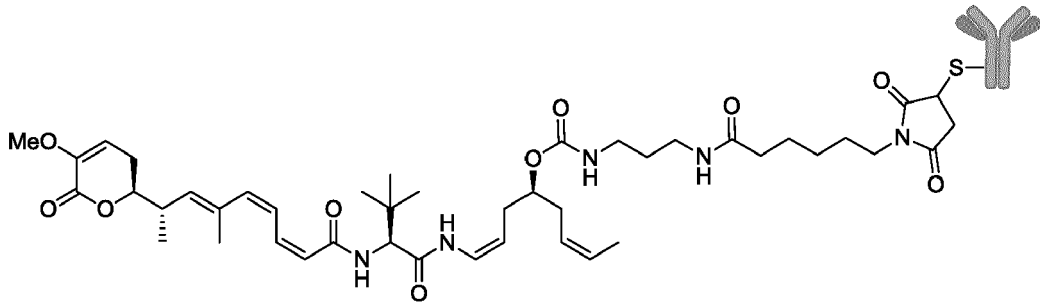
5 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y más preferiblemente se selecciona de trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; y

10 n es la razón de los grupos  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en los que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y preferiblemente 4.

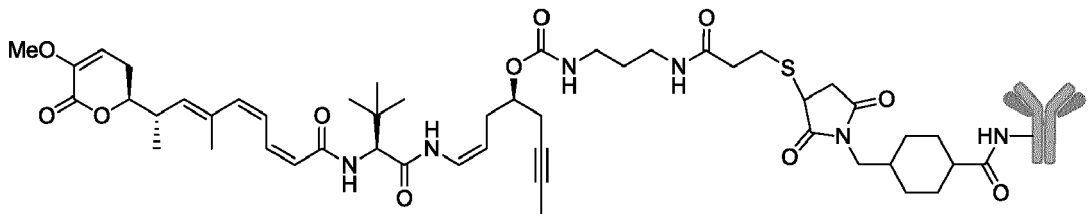
j) un conjugado anticuerpo-fármaco según el primer aspecto de la presente invención, seleccionado del grupo que consiste en:

15



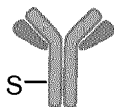
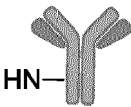


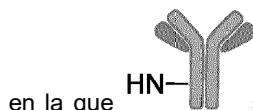
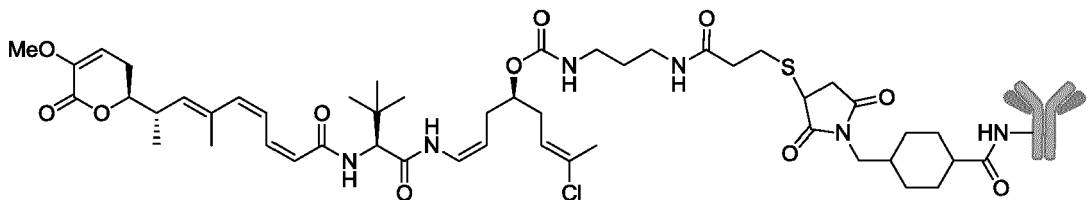
y




5

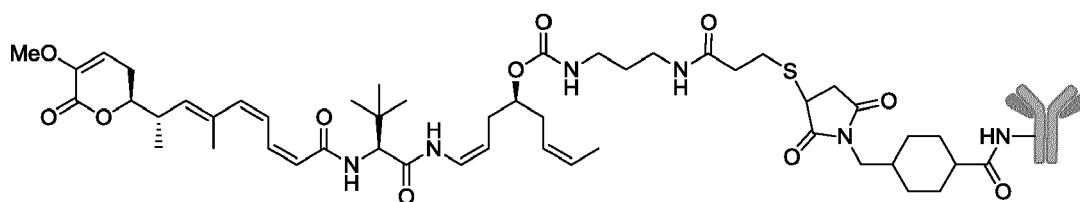


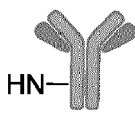
en las que cada uno de  y  se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o 10 alternativamente un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo. Más preferiblemente, el conjugado anticuerpo-fármaco se selecciona del grupo que consiste en:

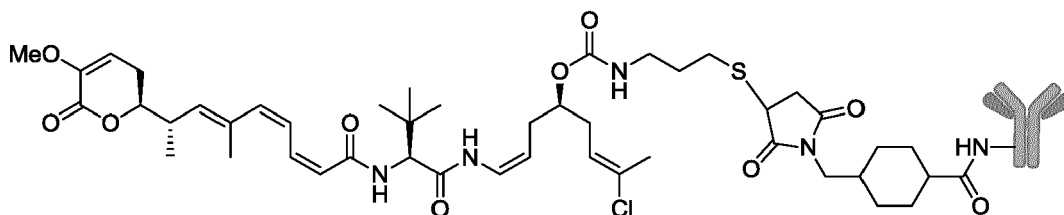


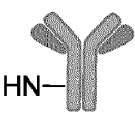
en la que  se selecciona de trastuzumab y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente

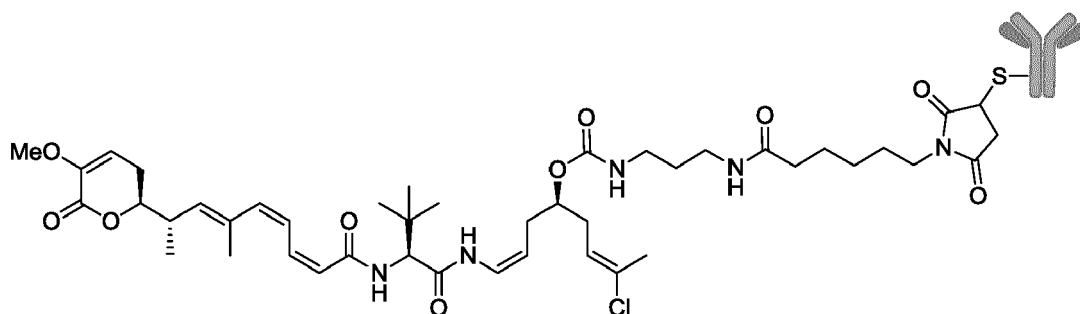
activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o preferiblemente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo,

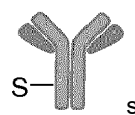


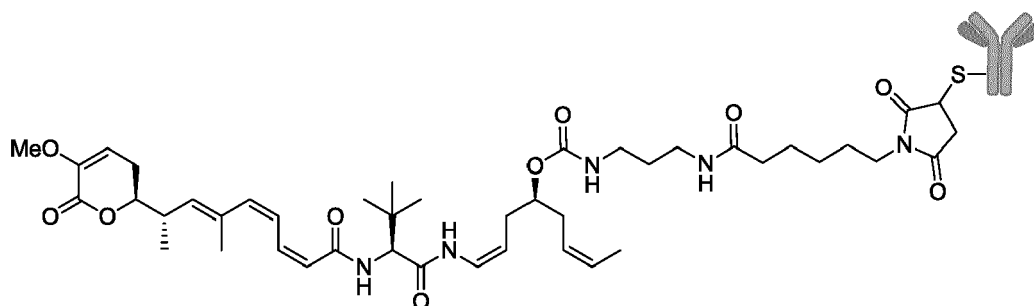
5 en la que  es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo,

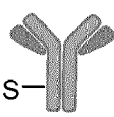


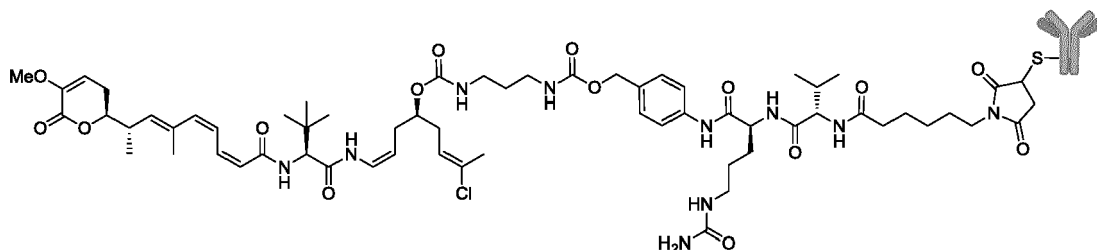
en la que  es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo,

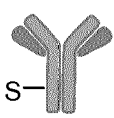


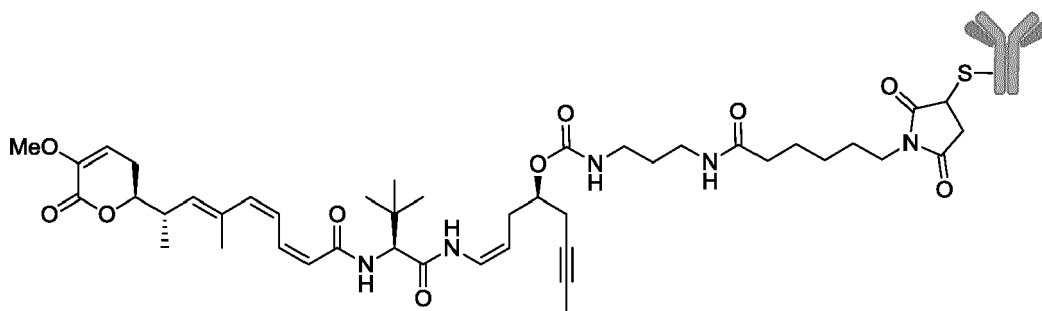
10 en la que  se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o alternativamente un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo,

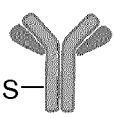


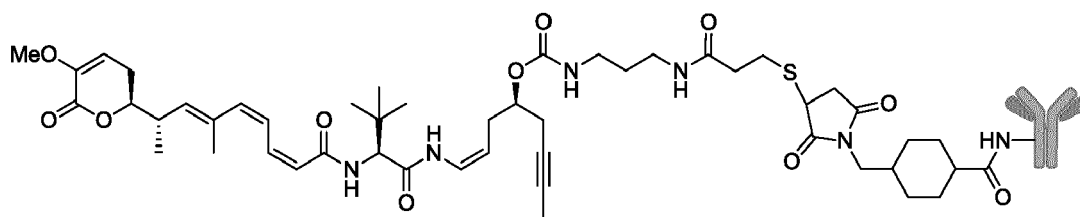
en la que  es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo,

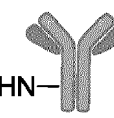


5 en la que  se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o alternatively un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo,



10 en la que  es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y



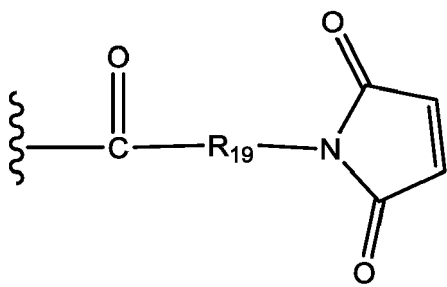
en la que  es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.

De manera particularmente preferible, los conjugados anticuerpo-fármaco según la presente invención deberían estar en forma aislada o purificada.

15 Los compuestos preferidos de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-(L<sub>1</sub>)<sub>b</sub> según el segundo aspecto de la presente invención, incluyen:

- un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según el segundo aspecto de la presente invención, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de unión de fórmula:



en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a un  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a X;

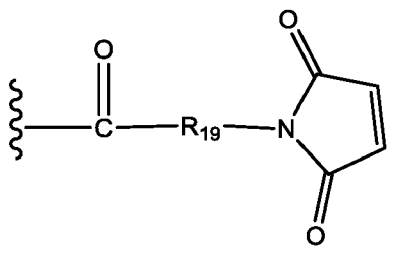
5  $R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_{12}$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_{12}$ ), -arileno  $C_6-C_{12}$  en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -arileno  $C_6-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-$   
 10  $C_{12}$ -alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -heterociclo  $C_5-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -alquileo  $C_1-C_{12}$ -  
 (heterociclo  $C_5-C_{12}$ -) en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose  
 15 opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -(heterociclo  $C_5-C_{12}$ )-alquileo  $C_1-C_{12}$ - en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes  $R_x$ ,  $-(OCH_2CH_2)_r-$  y  $-CH_2-(OCH_2CH_2)_r-$ , en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

r es un número entero que oscila entre 1-6; y

20 cada uno de D, X, AA y w son tal como se definen en el primer aspecto de la invención.

• un compuesto de fórmula  $D-X-(AA)_w-L_1$  o de fórmula  $D-X-(AA)_w-H$  según el segundo aspecto de la presente invención, en el que:

$L_1$  es un grupo de unión de fórmula:

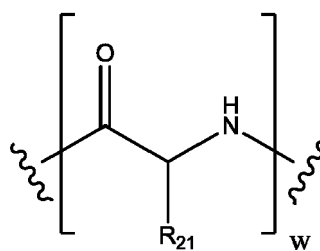


25 en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a un  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a X;

$R_{19}$  se selecciona de -alquileo  $C_1-C_3$ -, -O-(alquileo  $C_1-C_8$ ), -alquileo  $C_1-C_3$ -arileno  $C_6-C_{12}$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , -arileno  $C_6-$   
 30  $C_{12}$ -alquileo  $C_1-C_8$ - en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

$(AA)_w$  es de fórmula (II):



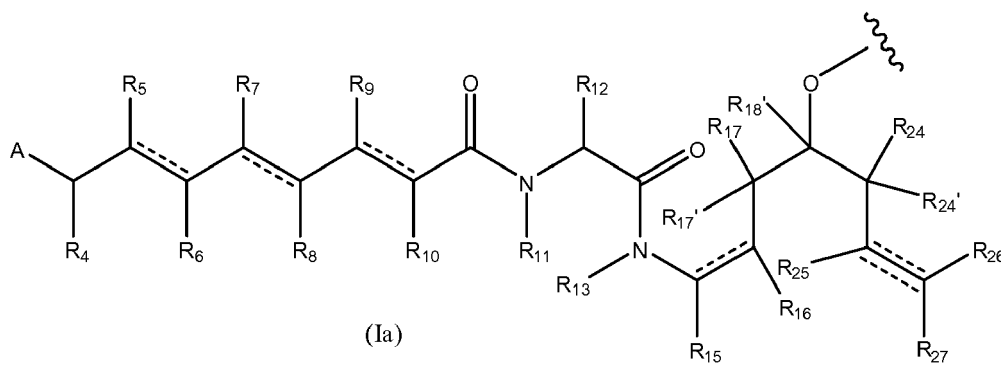
(II)

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a L<sub>1</sub> o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

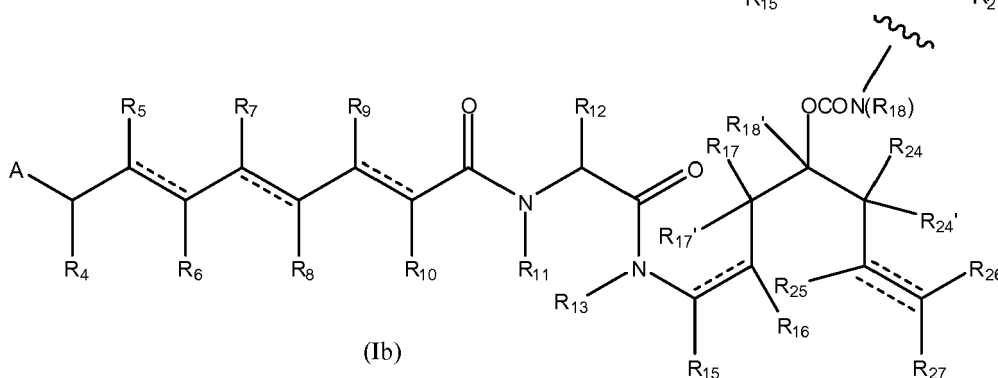
5 en la que R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, sec-butilo, bencilo, indolilmetilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, y w es un número entero desde 0 hasta 6;

10 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

20 D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o una fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en la que:



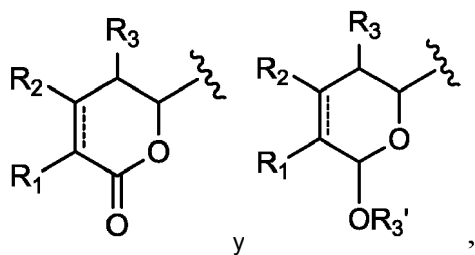
(Ia)



(Ib)

en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a X;

A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en los que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 5 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>3</sub>' se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub>, y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 10 cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17</sub>', R<sub>18</sub>', R<sub>24</sub>, R<sub>24</sub>', R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

- 15 hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

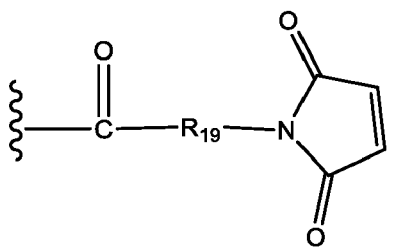
- 20 R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub> y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 25 y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.

• un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según el segundo aspecto de la presente invención, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de fórmula:



30

en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

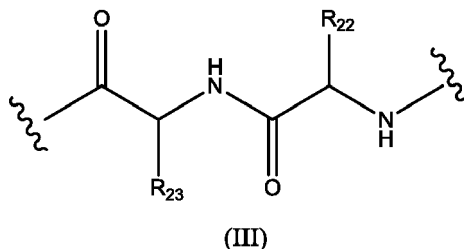
- 35 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, fenileno-alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- en el que el grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, en los que cada uno de los sustituyentes de alquilenos anteriores, ya sea o



bien solos o bien unidos a otro resto en la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, y preferiblemente  $R_{19}$  es un grupo alquileo  $C_1-C_6$ ;

5

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces  $(AA)_w$  es de fórmula (III):



en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a  $L_1$  o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

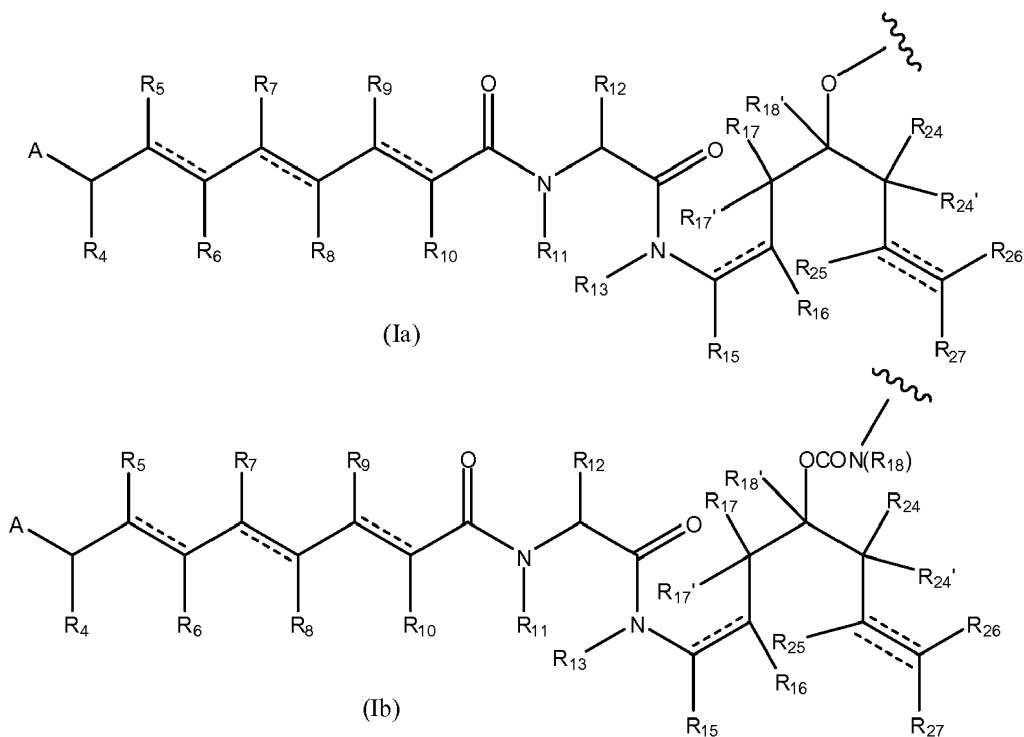
10  $R_{22}$  se selecciona de metilo, bencilo, isopropilo, sec-butilo e indolilmetilo;

$R_{23}$  se selecciona de metilo,  $-(CH_2)_4NH_2$ ,  $-(CH_2)_3NHCONH_2$  y  $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ ;

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-CONH-(alquileo\ C_2-C_4)NH-$ ,  $-CONH(alquileo\ C_2-C_4)NHCOO-CH_2-$  (fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH,  $-CONH-(alquileo\ C_2-C_4)S-$ ,  $-CONH-(alquileo\ C_2-C_4)NHCO-(alquileo\ C_1-C_3)S-$ ,  $-(alquileo\ C_2-C_4)NHCO(alquileo\ C_1-C_3)S-$ ,  $-(alquileo\ C_2-C_4)S-$ ,  $-(alquileo\ C_2-C_4)NH-$  y  $-(alquileo\ C_2-C_4)NH-COO-CH_2-$  (fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

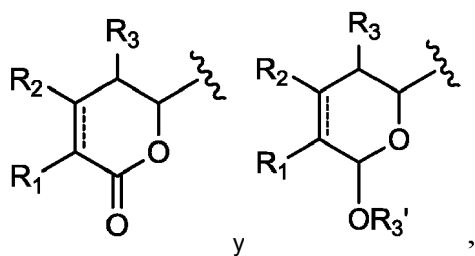
20

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o a fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo:



25 en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a X;

A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;

5 cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;

R<sub>3'</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo;

R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo;

10 cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente hidrógeno y metilo;

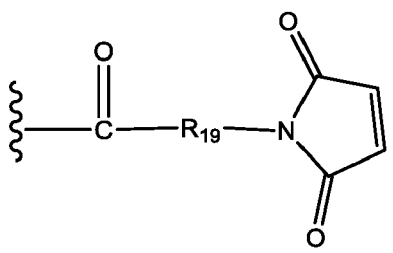
R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno y fenilo, y preferiblemente hidrógeno;

R<sub>27</sub> es hidrógeno o halógeno;

15 y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.

• un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según el segundo aspecto de la presente invención, en el que:

20 L<sub>1</sub> es un grupo de unión de fórmula:

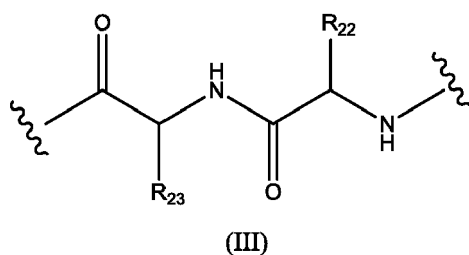


en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a un (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

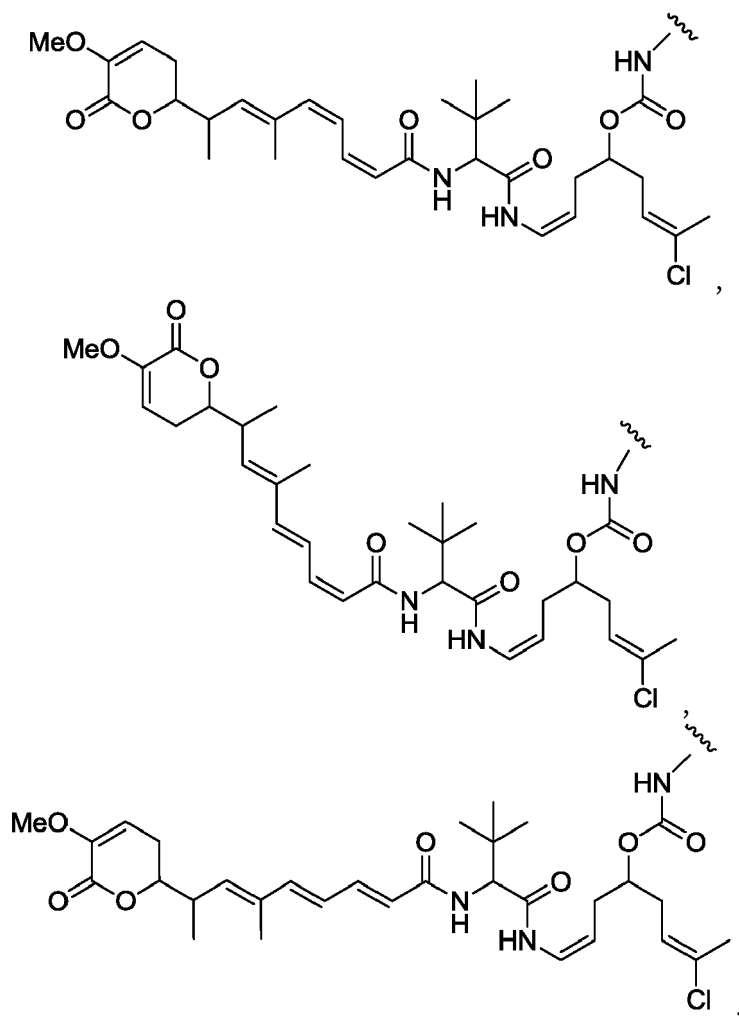
25 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):

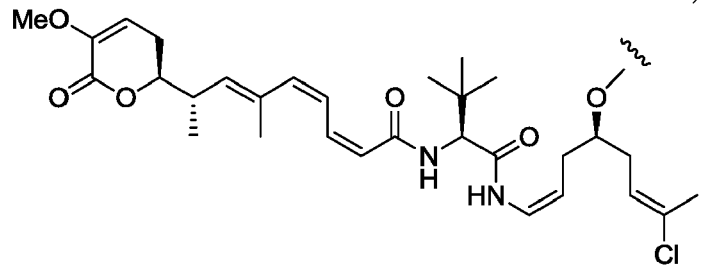
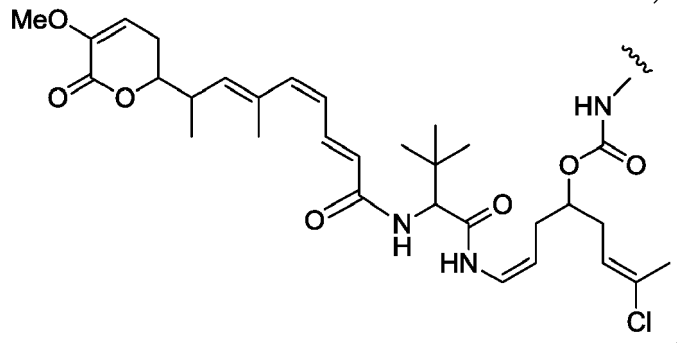
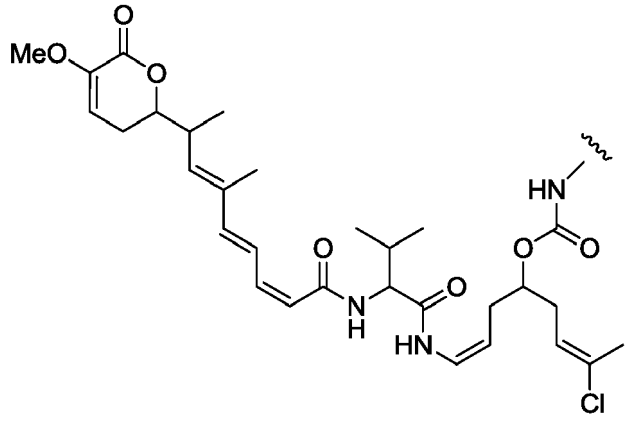
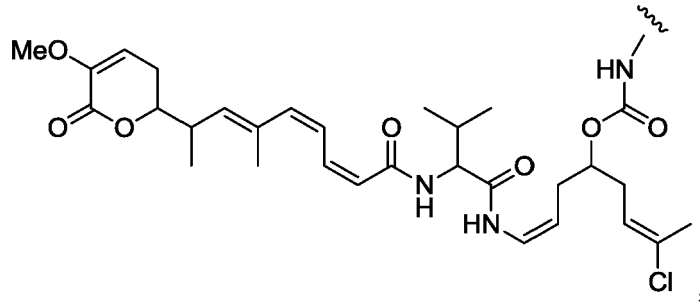
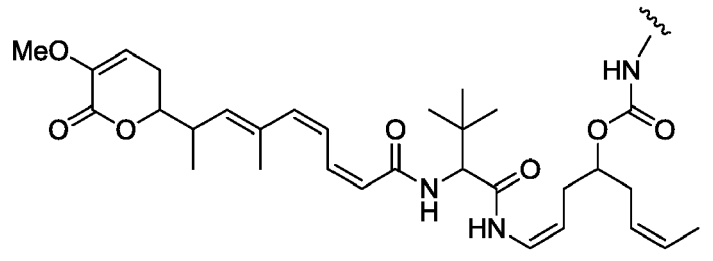


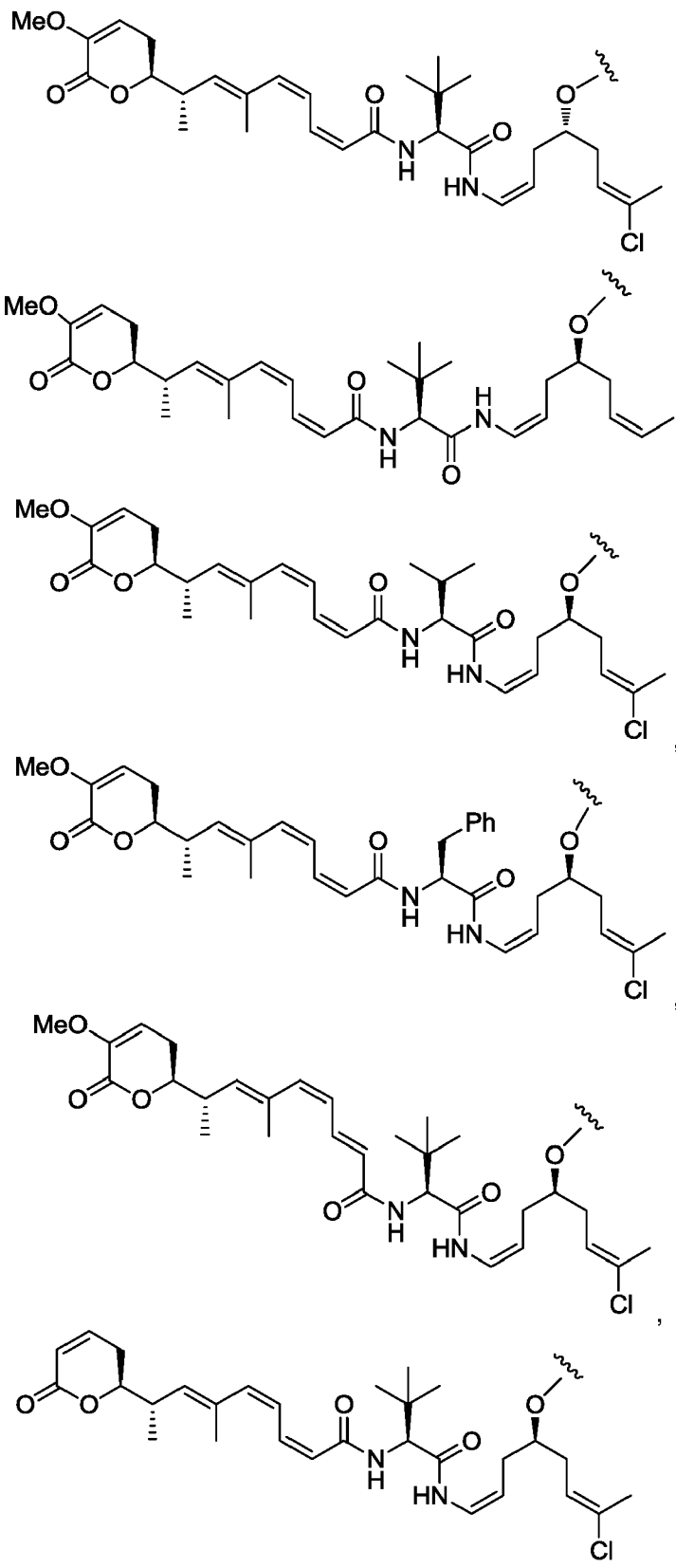
$R_{22}$  es isopropilo,  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ , en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a  $L_1$  o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

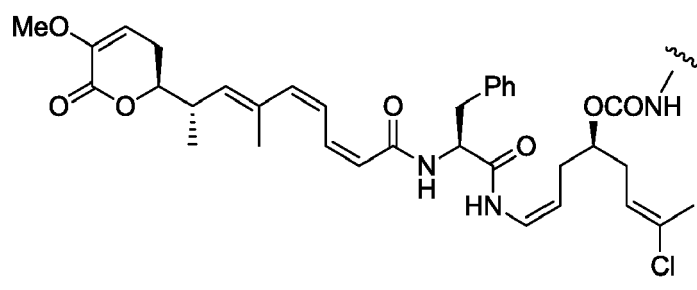
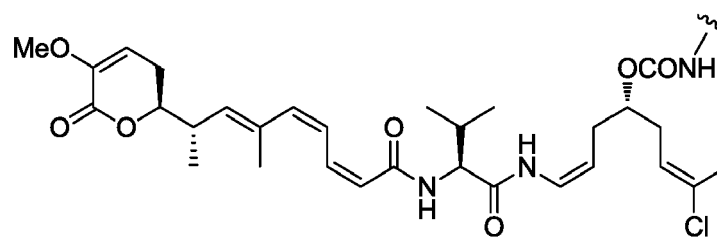
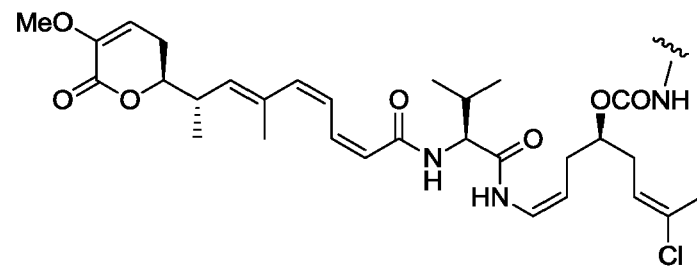
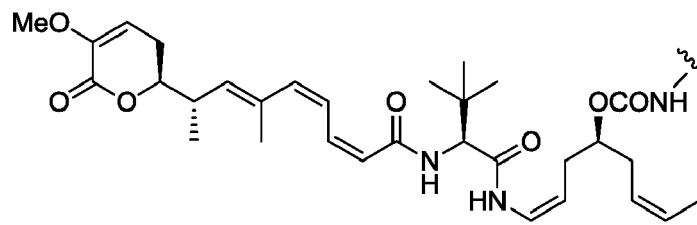
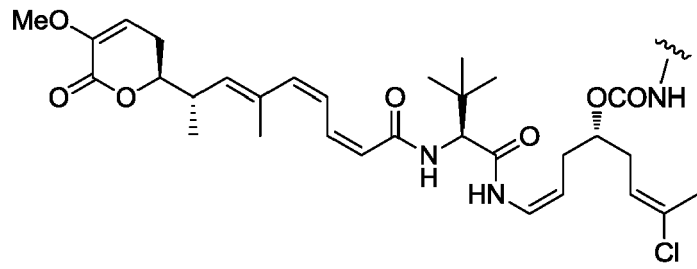
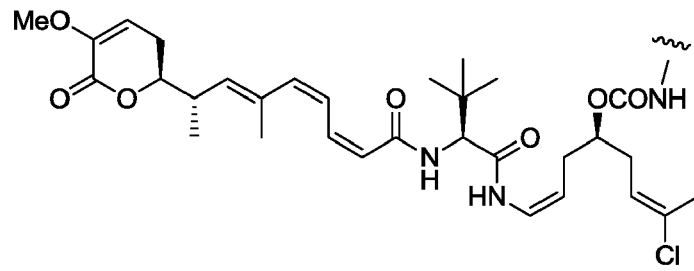
X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en  $-\text{CONH}-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}-$ ,  $-\text{COO}-\text{CH}_2$ -fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano,  $-\text{CONH}-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}-\text{COOCH}_2$ -(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-,  $-\text{CONH}-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{S}-$ ,  $-\text{CONH}-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NHCO}(\text{alquileo } C_1-C_3)\text{S}-$ ,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NHCO}(\text{alquileo } C_1-C_3)\text{S}-$ ,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{S}-$ ,  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}-$  y  $-(\text{alquileo } C_2-C_4)\text{NH}-\text{COO}-\text{CH}_2$ -(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

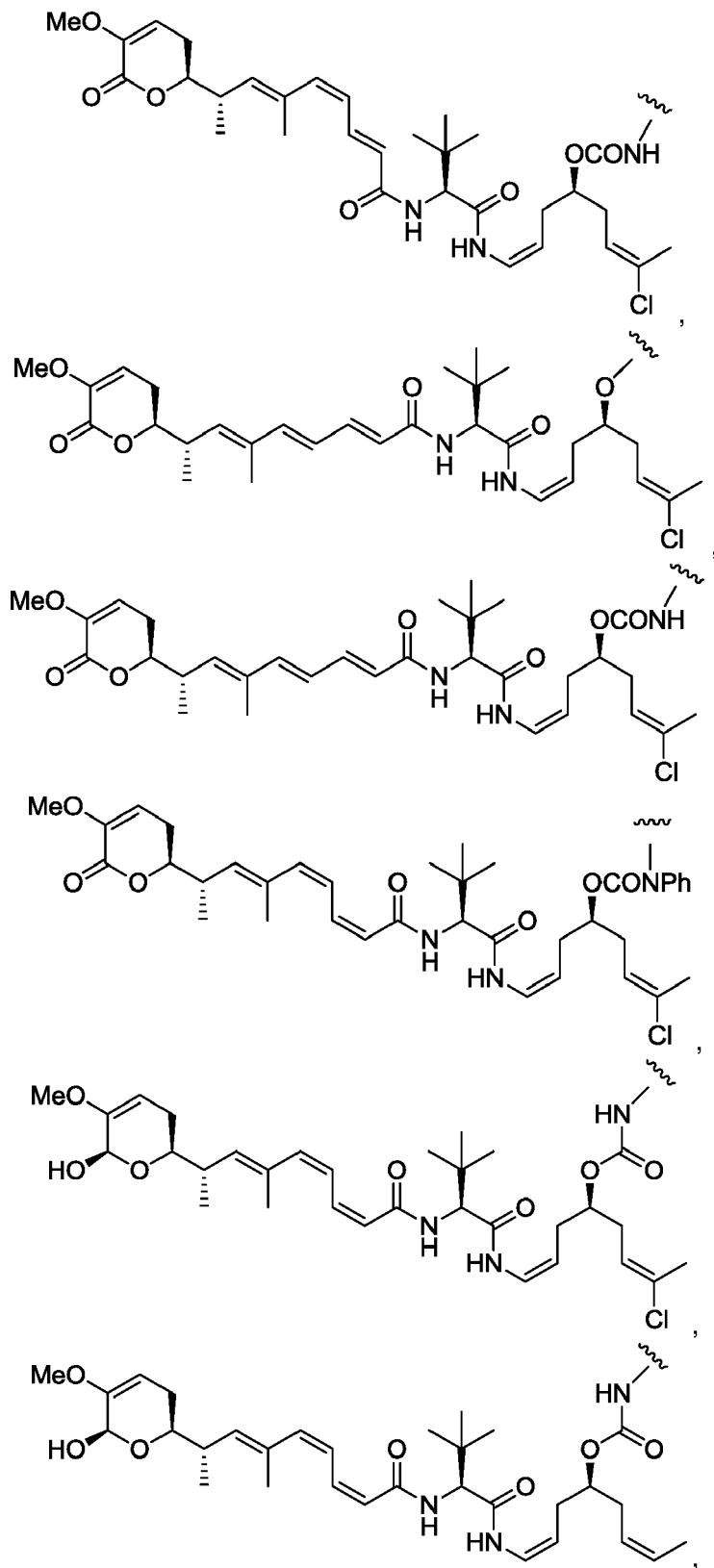
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado del siguiente grupo:

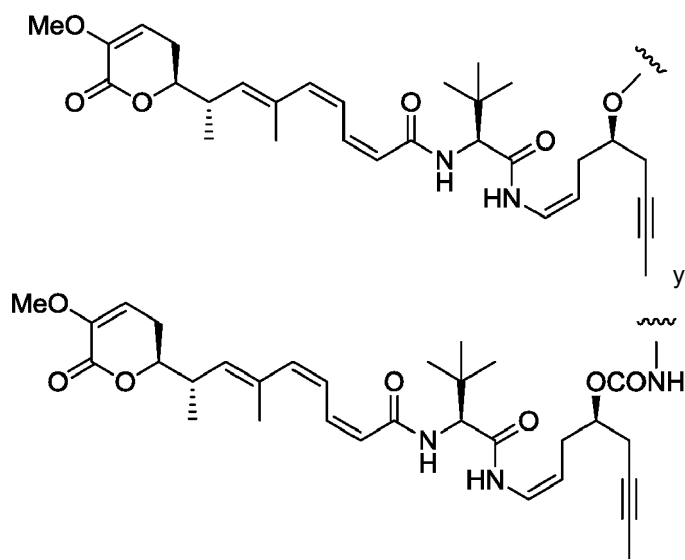








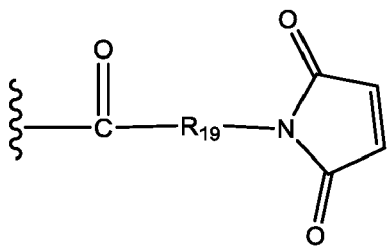




en las que la línea ondulada indica el punto de unión covalente a X.

- 5 • un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según el segundo aspecto de la presente invención, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de fórmula:

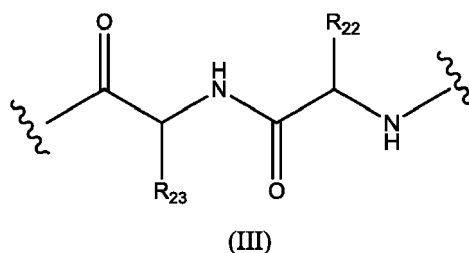


en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a un (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

- 10 R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>5</sub>-;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):

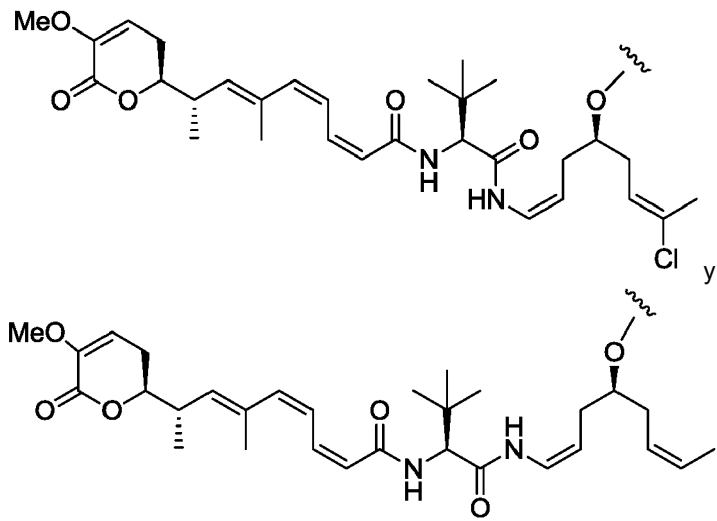


en la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a L<sub>1</sub> o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

- 15 X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-; y

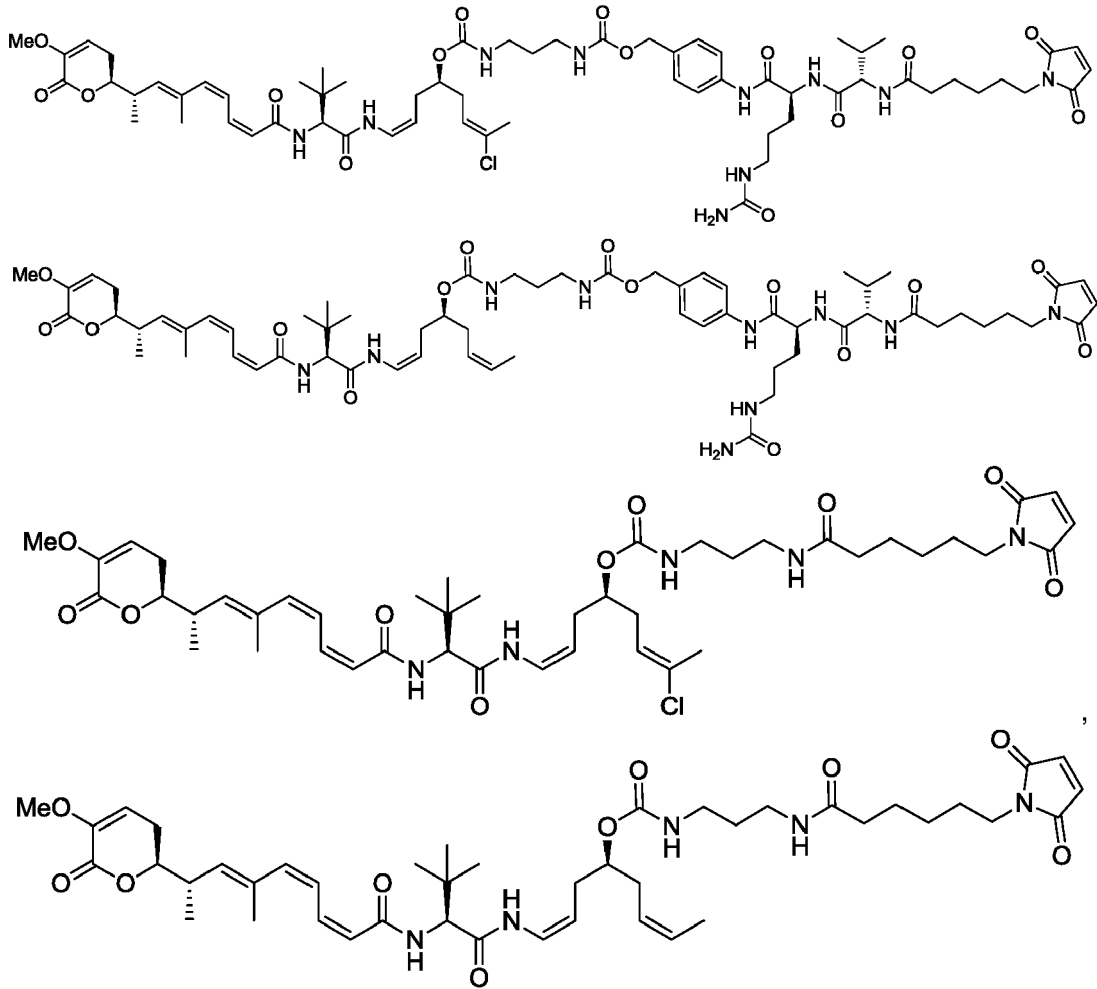
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:





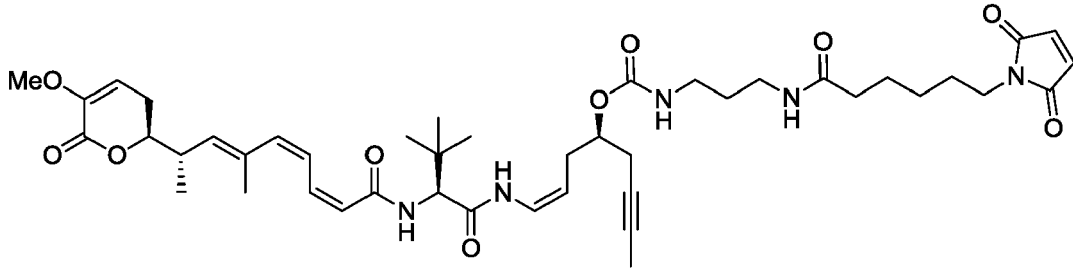
en las que la línea ondulada indica el punto de unión covalente a X.

• un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> seleccionado de:

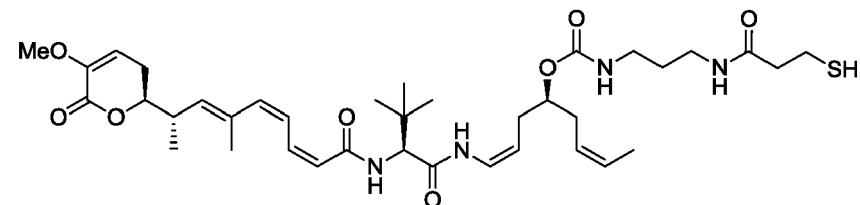
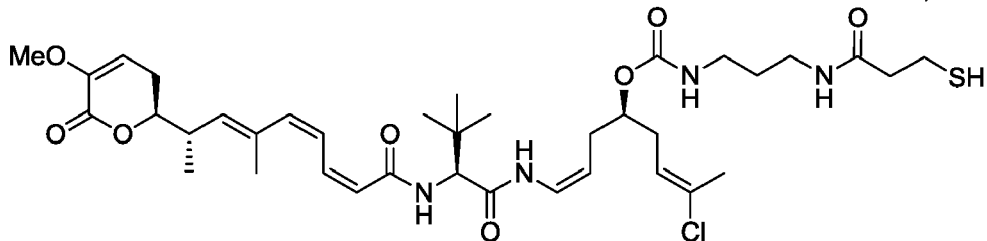
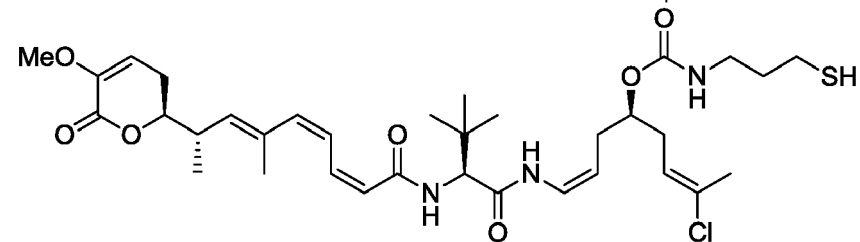
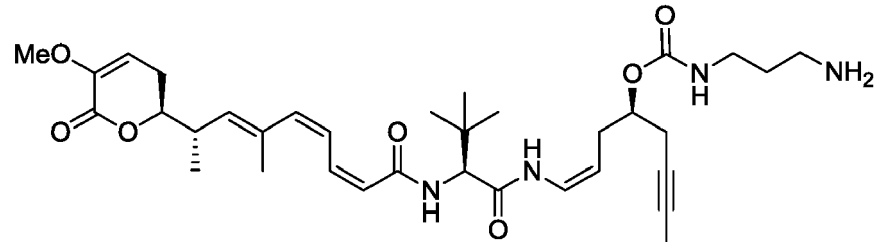
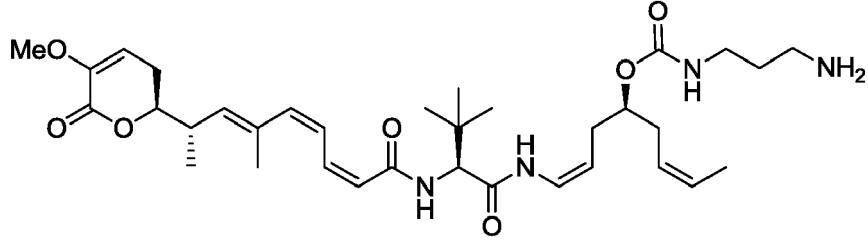
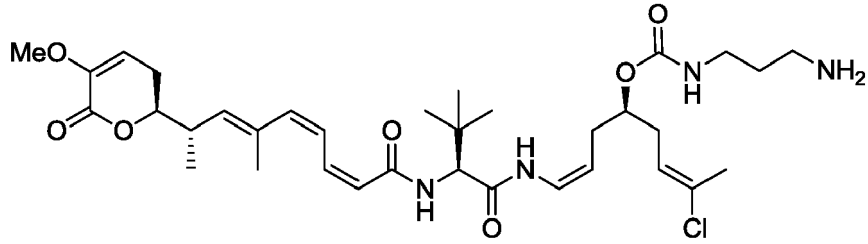


5

y

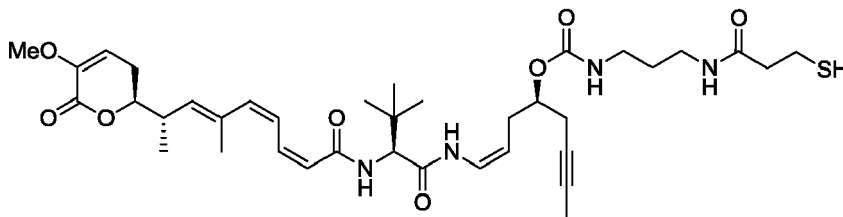


• un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H seleccionado de:



5

, y



El término “sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, solvatos, tautómeros o estereoisómeros” en los conjugados de fármaco de la presente invención se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster, solvato, hidrato o forma estereoisomérica o cualquier otro compuesto que, tras la administración al paciente puede proporcionar un compuesto tal como se describe en el presente documento, ya sea directa o indirectamente. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también estarán dentro del alcance de la invención ya que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, profármacos y derivados puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir del compuesto original, que contiene un resto básico o ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Los ejemplos de las sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales de álcali orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y sales básicas de aminoácidos.

Los conjugados de fármaco de la presente invención pueden estar en forma cristalina o bien como compuestos libres o bien como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente dentro de la técnica.

El término “profármaco” se usa en su sentido más amplio y abarca los derivados que se convierten *in vivo* en los compuestos de la invención. Tales derivados se les ocurrirían fácilmente a los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, compuestos en los que un grupo hidroxilo libre se convierte en un derivado de éster. Muchos profármacos adecuados se conocen bien por el experto en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Burger “Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 6ª ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y “Design and Applications of Prodrugs” (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers).

En relación con los compuestos de la presente invención, los ésteres farmacológicamente aceptables no se restringen particularmente, y pueden seleccionarse por una persona con una experiencia habitual en la técnica. En el caso de dichos ésteres, es preferible que tales ésteres puedan escindirse mediante un procedimiento biológico tal como hidrólisis *in vivo*. El grupo que constituyen dichos ésteres (el grupo mostrado como R cuando los ésteres del mismo se expresan como -COOR) pueden ser un, por ejemplo, grupo alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como metoxietilo, 1-etoxietilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-(isopropoxi)etilo, 2-metoxietilo, 2-etoxietilo, 1,1-dimetil-1-metoximetilo, etoximetilo, propoximetilo, isopropoximetilo, butoximetilo o t-butoximetilo; un grupo alcoxilato C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como 2-metoxietoximetilo; un grupo ariloxilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como fenoximetilo; un grupo halogenado alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como 2,2,2-tricloroetoximetilo o bis(2-cloroetoxi)metilo; un grupo alcocarbonilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como metoxicarbonilmetilo; un grupo cianoalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como cianometilo o 2-cianoetilo; un grupo alquiltiommetilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como metiltiommetilo o etiltiommetilo; un grupo ariltiommetilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> tal como feniltiommetilo o naftiltiommetilo; un grupo alquilsulfonilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo inferior C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, que puede sustituirse opcionalmente con un(os) átomo(s) de halógeno tal como 2-metanosulfoniletilo o 2-trifluorometanosulfoniletilo; un grupo arilsulfonilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como 2-bencenosulfoniletilo o 2-toluenosulfoniletilo; un grupo aciloxilo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como formiloximetilo, acetoximetilo, propioniloximetilo, butiriloximetilo, pivaloiloximetilo, valeriloximetilo, isovaleriloximetilo, hexanoiloximetilo, 1-formiloxietilo, 1-acetoxietilo, 1-propioniloxietilo, 1-butililoxietilo, 1-pivaloiloxietilo, 1-valeriloxietilo, 1-isovaleriloxietilo, 1-hexanoiloxietilo, 2-formiloxietilo, 2-acetoxietilo, 2-propioniloxietilo, 2-butililoxietilo, 2-pivaloiloxietilo, 2-valeriloxietilo, 2-isovaleriloxietilo, 2-hexanoiloxietilo, 1-formiloxipropilo, 1-acetoxipropilo, 1-propioniloxipropilo, 1-butililoxipropilo, 1-pivaloiloxipropilo, 1-valeriloxipropilo, 1-isovaleriloxipropilo, 1-hexanoiloxipropilo, 1-acetoxibutilo, 1-propioniloxibutilo, 1-butililoxibutilo, 1-pivaloiloxibutilo, 1-acetoxipentilo, 1-propioniloxipentilo, 1-butililoxipentilo, 1-pivaloiloxipentilo o 1-pivaloiloxihexilo; un grupo cicloalquilcarboniloxilo C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como ciclopentilcarboniloximetilo, ciclohexilcarboniloximetilo, 1-ciclopentilcarboniloxietilo, 1-ciclohexilcarboniloxietilo, 1-ciclopentilcarboniloxipropilo, 1-ciclohexilcarboniloxipropilo, 1-ciclopentilcarboniloxibutilo o 1-ciclohexilcarboniloxibutilo; un grupo arilcarboniloxilo

C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como benzoiloximetilo; un grupo alcoxicarboniloxilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como metoxicarboniloximetilo, 1-(metoxicarboniloxi)etilo, 1-(metoxicarboniloxi)propilo, 1-(metoxicarboniloxi)butilo, 1-(metoxicarboniloxi)pentilo, 1-(metoxicarboniloxi)hexilo, etoxicarboniloximetilo, 1-(etoxicarboniloxi)etilo, 1-(etoxicarboniloxi)propilo, 1-(etoxicarboniloxi)butilo, 1-(etoxicarboniloxi)pentilo, 1-(etoxicarboniloxi)hexilo, propoxicarboniloximetilo, 1-(propoxicarboniloxi)etilo, 1-(propoxicarboniloxi)propilo, 1-(propoxicarboniloxi)butilo, isopropoxicarboniloximetilo, 1-(isopropoxicarboniloxi)etilo, 1-(isopropoxicarboniloxi)butilo, butoxicarboniloximetilo, 1-(butoxicarboniloxi)etilo, 1-(butoxicarboniloxi)propilo, 1-(butoxicarboniloxi)butilo, isobutoxicarboniloximetilo, 1-(isobutoxicarboniloxi)etilo, 1-(isobutoxicarboniloxi)propilo, 1-(isobutoxicarboniloxi)butilo, t-butoxicarboniloximetilo, 1-(t-butoxicarboniloxi)etilo, pentiloxicarboniloximetilo, 1-(pentiloxicarboniloxi)etilo, 1-(pentiloxicarboniloxi)propilo, hexiloxicarboniloximetilo, 1-(hexiloxicarboniloxi)etilo o 1-(hexiloxicarboniloxi)propilo; un grupo cicloalquiloxicarboniloxilo C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> tal como ciclopentiloxicarboniloximetilo, 1-(ciclopentiloxicarboniloxi)etilo, 1-(ciclopentiloxicarboniloxi)propilo, 1-(ciclopentiloxicarboniloxi)butilo, ciclohexiloxicarboniloximetilo, 1-(ciclohexiloxicarboniloxi)etilo, 1-(ciclohexiloxicarboniloxi)propilo o 1-(ciclohexiloxicarboniloxi)butilo; un grupo [5-(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo tal como (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-etil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-propil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, (5-isopropil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo o (5-butil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo; un [5-(fenilo, que puede sustituirse opcionalmente con un grupo alquil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o átomo(s) de halógeno-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo tal como (5-fenil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, [5-(4-metilfenil)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo, [5-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo, [5-(4-fluorofenil)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo o [5-(4-clorofenil)-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il]metilo; o un grupo ftalidilo, que puede sustituirse opcionalmente con un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o grupo(s) alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, tal como ftalidilo, dimetilftalidilo o dimetoxiftalidilo, y es preferiblemente un grupo pivaloiloximetilo, grupo ftalidilo o grupo (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo, y más preferiblemente un grupo (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo.

Los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento pueden tener centros asimétricos y, por tanto, existir en diferentes formas enantioméricas. Todos los isómeros ópticos y estereoisómeros de los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención. Por tanto, cualquier compuesto dado al que se hace referencia en el presente documento se pretende que represente una cualquiera de un racemato, una o más formas enantioméricas, una o más formas diastereoméricas, una o más formas atropisoméricas, y mezclas de los mismos. Particularmente, los conjugados de fármaco de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab y compuestos de fórmula DX-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o D-X-(AA)<sub>w</sub>-H pueden incluir enantiómeros dependiendo de su asimetría o diaestereoisómeros. Es posible también el estereoisomerismo sobre el doble enlace, por tanto, en algunos casos la molécula puede existir como un isómero (E) o un isómero (Z). Si la molécula contiene muchos dobles enlaces, cada doble enlace tendrá su propio estereoisomerismo, que puede ser el mismo o diferente que el estereoisomerismo de los otros dobles enlaces de la molécula. Los isómeros únicos y las mezclas de isómeros entran dentro del alcance de la presente invención.

Además, los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento pueden existir como isómeros geométricos (es decir, isómeros *cis* y *trans*), como tautómeros o como atropisómeros. Específicamente, el término tautómero se refiere a uno de dos o más isómeros estructurales de un compuesto que existe en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica en otra. Los pares tautoméricos habituales son amina-imina, amida-imida, ceto-enol, lactama-lactima, etc. De manera adicional, cualquier compuesto al que se hace referencia en el presente documento se pretende que represente hidratos, solvatos y polimorfos, y mezclas de los mismos cuando tales formas existen en el medio.

Todos los isómeros geométricos, tautómeros, atropisómeros, hidratos, solvatos y polimorfos de los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

En los compuestos de la presente invención, Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno.

Donde Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno, el resto es preferiblemente un péptido de unión a antígeno o polipéptido. En una realización preferida, el resto es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El término "anticuerpo" en los conjugados de fármaco de la presente invención se refiere a cualquier inmunoglobulina, preferiblemente una inmunoglobulina de longitud completa. Preferiblemente, el término cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpo de los mismos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos pueden derivarse de cualquier especie, pero preferiblemente son de origen de roedor, por ejemplo, rata o ratón, humano o de conejo. Alternativamente, los anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, pueden ser humanizados, quiméricos o fragmentos de anticuerpo de los mismos. El término "anticuerpos quiméricos" también puede incluir anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécido, simio, etc.) y secuencias humanas de regiones constantes. Las inmunoglobulinas también pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población sustancialmente homogénea de moléculas de

anticuerpos (es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores), producidas por un único clon de células de linaje B, a menudo un hibridoma. De manera importante, cada anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad antigénica, es decir, se dirige contra un determinante único en el antígeno.

- 5 La producción de anticuerpos monoclonales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, como ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden elaborarse mediante el método del hibridoma (Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4: 72), o la técnica del hibridoma de VEB (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Alternativamente, el anticuerpo monoclonal puede producirse usando métodos de ADN recombinante (véase, el documento US 4816567) o aislarse de las bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597.

Los anticuerpos policlonales son anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos). Esta población heterogénea de anticuerpo puede derivarse de los sueros de animales inmunizados usando diversos procedimientos bien conocidos en la técnica.

- 15 El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo artificial que se compone de dos anticuerpos monoclonales diferentes. Pueden diseñarse para unirse o bien a dos epítomos adyacentes en un único antígeno, aumentándose de ese modo tanto la avidéz como la especificidad, o unirse a dos antígenos diferentes para numerosas aplicaciones, pero particularmente para el reclutamiento de linfocitos citolíticos naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (NK) o el redireccionamiento de toxinas, radionúclidos o fármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer (Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, 9, 23). El anticuerpo biespecífico puede tener una cadena pesada híbrida de inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera híbrido de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en una sola mitad de la molécula biespecífica se contempla como una manera fácil de separación (documento WO 94/04690; Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210; Rodrigues *et al.*, 1993, *J. of Immunology* 151:6954-6961; Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:163-167; Carter *et al.*, 1995, *J. of Hematotherapy* 4:463-470; Merchant *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681.

- 20 Los métodos para preparar anticuerpos híbridos o biespecíficos se conocen en la técnica. En un método, pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante la fusión de dos hibridomas en un único "cuadroma" mediante reticulación química o fusión genética de dos módulos Fab o scFv diferentes (Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology*, 2005, 9, 23).

- 25 El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que se derivan porciones diferentes de especies animales diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede derivarse de la región variable de un ratón y la región constante de un ser humano. Por lo contrario, un "anticuerpo humanizado" proviene de manera predominante de un ser humano, aun cuando contenga porciones no humanas. Específicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de regiones hipervariables de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para mejorar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana.

- 30 Pueden producirse anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Pueden producirse anticuerpos completamente humanos usando ratones transgénicos que no pueden expresar los genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes humanos de cadenas pesadas y ligeras. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para un resumen de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos humanos monoclonales y protocolos para producir tales anticuerpos, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806. Otros anticuerpos humanos pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA).

El término “fragmento de unión a antígeno” en los conjugados de fármaco de la presente invención se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa en el que dichos fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos conservan la función de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente. El fragmento de unión a antígeno puede comprender una porción de una región variable de un anticuerpo, dicha porción que comprende al menos una, dos, preferiblemente tres CDR seleccionadas de CDR1, CDR2 y CDR3. El fragmento de unión a antígeno también puede comprender una porción de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, di-scFv y BiTE (acopladores biespecíficos de linfocitos T), fragmentos Fv incluyendo Nanobodies, diacuerpos, fusiones de diacuerpo-Fc, triacuerpos y tetracuerpos; minicuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de complementariedad), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se une de manera inmuno-específica a un antígeno diana tal como a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpos de una sola cadena o de un solo dominio incluyendo anticuerpos de cadena pesada solamente, por ejemplo, dominios VHH de camélido y V-NAR de tiburón; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. A modo de comparación, un anticuerpo de longitud completa, denominado “anticuerpo” es uno que comprende dominios VL y VH, así como dominios constantes de cadena ligera y pesada completos.

El anticuerpo también puede tener uno o más funciones efectoras, que se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos modificada por ingeniería según métodos en la técnica para alterar la unión al receptor) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a Clq; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc.

El anticuerpo también puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une de manera inmuno-específica a un antígeno diana tal como un antígeno de células cancerosas, antígeno viral o antígeno microbiano u otros anticuerpos unidos a células tumorales. Con respecto a esto, funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo puede provocar anticuerpos anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo reconocido. Específicamente, en una realización a modo de ejemplo la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante la delección de secuencias de región de entramado y de CDR que son C-terminales a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, pueden usarse péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo BIAcore), véanse, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E *et al.*, 1980, *J. de Immunology* 125(3):961-969).

El término “anticuerpo” también puede incluir una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo de la misma, por ejemplo, en la que el anticuerpo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en o bien el extremo N-terminal o bien el extremo C-terminal a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, tal como al menos una porción de 10, 20 ó 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse covalentemente a la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

Además, el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden incluir análogos y derivados de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que o bien se modifican, tal como por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que tal unión covalente permita al anticuerpo conservar su inmuno-especificidad de unión a antígeno. Los ejemplos de modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. De manera adicional, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención también pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones) en el dominio de Fc del anticuerpo. Específicamente, las modificaciones pueden ser en la región bisagra de Fc y dan como resultado una unión aumentada para el receptor de FcRn (documento WO 97/34631).

En una realización, el anticuerpo en el conjugado de fármaco de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal que es útil en el tratamiento de una enfermedad, preferiblemente cáncer. El cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón melanoma, leucemias, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), tumores sólidos tales como sarcoma y carcinomas, melanoma, mesotelioma, osteosarcoma, cáncer de ovario y cáncer renal. En una realización preferida el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma y cáncer de ovario. En una realización más preferida el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de

mama, leucemia, linfoma y cáncer de ovario.

Los anticuerpos que pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer incluyen anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125 (de ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de la próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), por ejemplo, proteína del receptor 2 del EGF (cáncer de mama), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor de antitransferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUCIKLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), receptor de IL-2 (linfomas y leucemia de linfocitos T), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), coriogonadotropina humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y producto del oncogén neu (carcinomas). Algunos anticuerpos útiles específicos incluyen AcM BR96 (Trail, P. A., *et al* Science (1993) 261, 212-215), BR64 (Trail, PA, *et al* Cancer Research (1997) 57, 100-105, AcM contra el antígeno CD40, tal como AcM S2C6 (Francisco, J. A., *et al* Cancer Res. (2000) 60:3225-3231), AcM contra el antígeno CD70, tal como AcM 1F6, y AcM contra el antígeno CD30, tal como ACIO (Bowen, M. A., *et al* (1993) J. Immunol., 151:5896- 5906; Wahl *et al.*, 2002 Cancer Res. 62(13):3736-42). Muchos otros anticuerpos de internalización que se unen a antígenos asociados a tumores pueden usarse y se han revisado (Franke, A. E., *et al* Cancer Biother Radiopharm. (2000) 15:459-76; Murray, J. L., (2000) Semin Oncol, 27:64-70; Breitling, F., y Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, y Sons, Nueva York, 1998).

Otros antígenos asociados a tumores incluyen BMPR1B, E16, STEAP1, STEAP2, 0772P. MPF, Napi3b, Sema5b, PSCA hlg, ETBR, MSG783, TrpM4, CRIPTO, CD21, CD79b, FcRH2, HER2, NCA, MDP, IL20R $\alpha$ , Brevican, EphB2R, ASLG659, PSCA, GEDA, BAFF-R, CD79A, CXCR5, HLA-DOB, P2X5, CD72, LY64, FCRH1, IRTA2 y TENB2.

En una realización alternativa, el anticuerpo en el conjugado de fármaco de la presente invención puede ser un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que se une de manera inmunespecífica a un antígeno viral, antígeno microbiano o un antígeno de una célula que produce anticuerpos autoinmunitarios asociados con enfermedad autoinmunitaria.

El antígeno viral puede incluir cualquier péptido, polipéptido o proteína viral tal como gp120 del VIH, nef del VIH, glicoproteína RSV F, neuraminidasa de virus influenza, hemaglutinina de virus de la gripe, tax de HTLV, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, Gb, Gc, Gd y Ge) y antígeno de superficie de la hepatitis B) que pueda provocar una respuesta inmunitaria. El antígeno microbiano puede incluir cualquier péptido, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido o molécula lipídica microbianas (por ejemplo, una bacteria, un hongo, protozoos patógenos o polipéptido de levadura incluyendo, por ejemplo, LPS y polisacárido capsular) que pueda provocar una respuesta inmunitaria.

En otra realización, el anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo conocido para el tratamiento o la prevención de infección viral o microbiana, es decir, una enfermedad infecciosa. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen PRO542 (Progenies) que es un anticuerpo de fusión contra CD4 útil para el tratamiento de infección por VIH; OsTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTOVIR. (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado IgG1 útil para el tratamiento de citomegalovirus (CMV); y anticuerpos anti-LPS.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyen anticuerpos contra los antígenos de cepas patógenas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*); hongos patógenos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y anquilostomas).

Otros anticuerpos útiles para el tratamiento de enfermedad viral incluyen anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, incluyendo como ejemplos y no como limitación: *Poxviridae*, *Herpesviridae*, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Enteroviridae*, *Picornaviridae*, *Parvoviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, virus influenza, virus parainfluenza, parotiditis, sarampión, virus respiratorio sincicial, rubéola,

*Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae*, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis no A/no B, *Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae* y virus de la inmunodeficiencia humana.

5 En una realización alternativa, el anticuerpo del conjugado de fármaco de la presente invención también puede ser cualquier anticuerpo conocido para el tratamiento de prevención de trastornos autoinmunitarios, tales como trastornos relacionados con linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis generalizada y enfermedad injerto contra huésped); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener y tuberculosis);  
 10 trastornos relacionados con linfocitos B activados (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes tipo I); y hepatitis crónica activa, enfermedad de Addison, alveolitis alérgica, reacción alérgica, rinitis alérgica, síndrome de Alport, anafaxis, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, artritis, ascariasis, aspergilosis, alergia atópica, dermatitis atópica, rinitis atrópica, enfermedad de Behcet, neumopatía de los avicultores, asma bronquial, síndrome de Caplan, miocardiopatía, enfermedad celíaca,  
 15 enfermedad de Chagas, glomerulonefritis crónica, síndrome de Cogan, enfermedad de las crioglobulinas, infección por rubéola congénita, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, síndrome de Dresser, síndrome de Eaton-Lambert, infección por virus ECHO, encefalomiénelitis, oftalmopatía endocrina, infección por virus de Epstein-Barr, huélfago equino, eritematosis, síndrome de Evan, síndrome de Felty, fibromialgia, ciclitis de Fuchs, atrofia gástrica, alergia gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Schoenlein Henoch, atrofia suprarrenal idiopática, fibritis pulmonar idiopática, nefropatía por IgA, enteropatías inflamatorias, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide juvenil, diabetes mellitus juvenil (tipo I), síndrome de Lambert-Eaton, laminitis, liquen plano, hepatitis lupoides, linfocitopenia lupoides, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido  
 25 conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, síndromes poliglandulares, demencia presenil, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artropatía psoriásica, fenómeno de Raynaud, aborto recurrente, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, síndrome de Sampter, esquistosomosis, síndrome de Schmidt, esclerodermia, síndrome de Shulman, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stiff-Man, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tiroiditis, trombocitopenia, hipertiroidismo, necrólisis epidérmica tóxica, resistencia a la insulina tipo B, diabetes mellitus tipo I, colitis ulcerosa, uveítis, vitiligo, macroglobulinemia de Waldenstrom y granulomatosis de Wegener.

Pueden obtenerse anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de una célula que es responsable de la producción de anticuerpos autoinmunitarios mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica tal como, por ejemplo, técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. Los ejemplos de anticuerpos autoinmunitarios incluyen anticuerpo antinuclear; anticuerpo anti-ADNbc; anticuerpo anti-ADNmc, anticuerpo IgM anticardiolipina, IgG; anticuerpo IgM antifosfolípido, IgG; anticuerpo anti SM; anticuerpo antimitocondrial; anticuerpo tiroideo; anticuerpo microsómico; anticuerpo tiroglobulina; anticuerpo anti SCL-70; anticuerpo anti-Jo; anticuerpo anti-U1 RNP; anticuerpo anti-La/SSB; anticuerpo anti SSA; anticuerpo anti SSB; anticuerpo anti células peritales; anticuerpo antihistonas; anticuerpo anti-RNP; C-ANCA; P-ANCA; anticuerpo anticentrómeros; anticuerpo antifibrilarina y anticuerpo anti-GBM.  
 35  
 40

En otra realización, el anticuerpo del conjugado de fármaco de la presente invención puede ser uno que se une a un receptor como a un complejo de receptores expresado en un linfocito activado, tal como uno asociado con una enfermedad autoinmunitaria. El receptor o complejo de receptores puede comprender un miembro de la superfamilia de los genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF, una integrina, una interleucina, un receptor de citocina, un receptor de quimiocina, una proteína mayor de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control de complementos. Los ejemplos de miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina adecuados son CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD13, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 e ICOS. Los ejemplos de miembros de la superfamilia de los receptores de TNF adecuados son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1 BB, TNF-RI, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TNFR-RI, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3. Los ejemplos de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD104. Los ejemplos de lectinas adecuadas son lectina de tipo C, de tipo S y de tipo I.  
 45  
 50

Un anticuerpo que se une a una diana molecular o un antígeno de interés, por ejemplo, antígeno ErbB2, es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil en la selección como diana de una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une a ErbB2, se unirá de manera habitualmente preferente a ErbB2 en vez de a otros receptores de ErbB, y puede ser uno que no reaccione de manera cruzada significativamente con otras proteínas tales como EGFR, ErbB 3 o ErbB4. En tales realizaciones, la extensión de la unión del anticuerpo a estas proteínas no ErbB2 (por ejemplo, unión de la superficie celular al receptor endógeno) será de menos del 10% tal como se determina mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmuno precipitación (RIA). Algunas veces, el anticuerpo anti-ErbB2 no reaccionará de manera cruzada significativamente con la proteína neu de rata, por ejemplo, tal como se describe en Schecter *et al.*, Nature 312:513 (1984) y Drebin *et al.*, Nature 312:545-548 (1984).  
 55  
 60



En otra realización, el anticuerpo del conjugado de fármaco o diana de la presente invención puede seleccionarse de un anticuerpo o diana en la tabla a continuación. Tales anticuerpos son inmunoespecíficos para un antígeno diana y pueden obtenerse comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante.

5 Tabla 1: anticuerpos monoclonales terapéuticos

Nombre	Nombre comercial	Diana
3F8		GD2
8H9		B7-H3
Abagovomab		CA-125 (imitación)
Abciximab	ReoPro	CD41 (integrina alfa-IIb)
Actoxumab		<i>Clostridium difficile</i>
Adalimumab	Humira	TNF- $\alpha$
Adecatumumab		EpCAM
Afelimomab		TNF- $\alpha$
Afutuzumab		CD20
Alacizumab pegol		VEGFR2
ALD518		IL-6
Alemtuzumab	Campath, MabCampath	CD52
Alirocumab		NARP-1
Altumomab		CEA
Amatuximab		mesotelina
Anatumomab		TAG-72
Anifrolumab		receptor de interferón $\alpha/\beta$
Anrukinzumab		IL-13
Apolizumab		cadena $\beta$ de HLA-DR
Arcitumomab	CEA-Scan	CEA
Aselizumab		L-selectina (CD62L)
Atinumab		RTN4
Atlizumab (= tocilizumab)	Actemra, RoActemra	receptor de IL-6
Atorolimumab		factor Rh
Bapineuzumab		beta amiloide
Basiliximab	Simulect	CD25 (cadena $\alpha$ del receptor de IL-2)
Bavituximab		fosfatidilserina
Belimumab	Benlysta, LymphoStat-B	BAFF
Benralizumab		CD125
Bertilimumab		CCL11 (eotaxina-1)
Besilesomab	Scintimun	antígeno relacionado con CEA
Bevacizumab	Avastin	VEGF-A
Bezlotoxumab		<i>Clostridium difficile</i>
Bicirimab	FibriScint	fibrina II, cadena beta
Bimagrumab		ACVR2B
Bivatuzumab		CD44 v6

ES 2 778 045 T3

Blinatumomab		CD19
Blosozumab		SOST
Brentuximab		CD30 (TNFRSF8)
Briakinumab		IL-12, IL-23
Brodalumab		IL-17
Canakinumab	Ilaris	IL-1 beta
Cantuzumab		MUC-1
Caplacizumab		VWF
Capromab		células de carcinoma prostático
Carlumab		MCP-1
Catumaxomab	Removab	EpCAM, CD3
CC49		TAG-72
Cedelizumab		CD4
Certolizumab pegol	Cimzia	TNF- $\alpha$
Cetuximab	Erbix	EGFR
Ch. 14.18		Disialogangliósido (GD2)
Citatumab		EpCAM
Cixutumumab		receptor de IGF-1
Clazakizumab		<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Clenoliximab		CD4
Clivatuzumab		MUC1
Conatumumab		TRAIL-R2
Concizumab		TFPI
CR6261		hemaglutinina de gripe A
Crenezumab		1-40- $\beta$ -amiloide
Dacetuzumab		CD40
Daclizumab	Zenapax	CD25 (cadena $\alpha$ del receptor de IL-2)
Dalotuzumab		receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I
Daratumumab		CD38 (ADP ribosa hidrolasa cíclica)
Demcizumab		DLL4
Denosumab	Prolia	RANKL
Detumomab		célula de linfoma B
Dorlimomab		Desconocida
Drozitumab		DR5
Duligotumab		HER3
Dupilumab		IL4
Dusigitumab		ILGF2
Ecromeximab		gangliósido GD3
Eculizumab	Soliris	C5
Edobacomab		Endotoxina
Edrecolomab	Panorex	EpCAM
Efalizumab	Raptiva	LFA-1 (CD11a)

ES 2 778 045 T3

Efungumab	Mycograb	Hsp90
Eldelumab		proteína inducida por interferón gamma
Elotuzumab		SLAMF7
Elsilimomab		IL-6
Enavatuzumab		receptor TWEAK
Enlimomab pegol		ICAM-1 (CD54)
Enokizumab		IL9
Enoticumab		DLL4
Ensituximab		5AC
Epitumomab		Episialina
Epratuzumab	LymphoCide	CD22
Erlizumab		ITGB2 (CD18)
Ertumaxomab	Rexomun	HER2/neu, CD3
Etaracizumab	Abegrin	integrina $\alpha_v\beta_3$
Etrolizumab		integrina $\alpha_7\beta_7$
Evolocumab		PCSK9
Exbivirumab		antígeno de superficie para la hepatitis B
Faralimomab		receptor de interferón
Farletuzumab		receptor de folato 1
Fasinumab		HNGF
FBTA05	Lymphomun	CD20
Felvizumab		virus respiratorio sincicial
Fezakinumab		IL-22
Ficlatuzumab		HGF
Figitumumab		receptor de IGF-1
Flanvotumab		glicoproteína 75
Fontolizumab	HuZAF	IFN- $\gamma$
Foralumab		CD3 épsilon
Foravirumab		glicoproteína del virus de la rabia
Fresolimumab		TGF- $\beta$
Fulranumab		NGF
Futuximab		EGFR
Galiximab		CD80
Ganitumab		IGF-I
Gantenerumab		beta amiloide
Gavilimomab		CD147 (basigina)
Gemtuzumab		CD33
Gevokizumab		IL-1 $\beta$
Girentuximab	Rencarex	anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)
Glebatumumab		GPNMB
Golimumab	Simponi	TNF- $\alpha$
Gomiliximab		CD23 (receptor de IgE)

ES 2 778 045 T3

GS6624		lisil oxidasa tipo 2
Guselkumab		IL13
Ibalizumab		CD4
Ibritumomab		CD20
Icrucumab		VEGFR-1
Igovomab	Indimacis-125	CA-125
Imciromab	Myoscint	miosina cardíaca
Imgatuzumab		EGFR
Inclacumab		selectina P
Indatuximab		SDC1
Infliximab	Remicade	TNF- $\alpha$
Inolimomab		CD25 (cadena $\alpha$ del receptor de IL-2)
Inotuzumab		CD22
Intetumumab		CD51
Ipilimumab	Yervoy	CD152
Iratumumab		CD30 (TNFRSF8)
Itolizumab		CD6
Ixekizumab		IL-17 <sup>a</sup>
Keliximab		CD4
Labetuzumab	CEA-Cide	CEA
Lambrolizumab		PDCD1
Lampalizumab		CFD
Lebrikizumab		IL-13
Lemalesomab		NCA-90 (antígeno de granulocitos)
Lerdelimumab		TGF beta 2
Lexatumumab		TRAIL-R2
Libivirumab		antígeno de superficie para la hepatitis B
Ligelizumab		IGHE
Lintuzumab	Smart M 195	CD33
Lirilumab		KIR2D
Lodelcizumab		PCSK9
Lorvotuzumab		CD56
Lucatumumab		CD40
Lumiliximab		CD23 (receptor de IgE)
Mapatumumab		TRAIL-R1
Margetuximab		ch4D5
Maslimomab		receptor de linfocitos T
Matuzumab		EGFR
Mavrilimumab		cadena $\alpha$ del receptor de GMCSF
Mepolizumab	Bosatria	IL-5
Metelimumab		TGF beta 1
Milatuzumab		CD74
Minretumomab		TAG-72

ES 2 778 045 T3

Mitumomab		gangliósido GD3
Mogamulizumab		CCR4
Morolimumab		factor Rh
Motavizumab	Numax	virus respiratorio sincicial
Moxetumomab		CD22
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	CD3
Nacolomab		antígeno C242
Namilumab		CSF2
Naptumomab		5T4
Narnatumab		RON
Natalizumab	Tysabri	integrina $\alpha_4$
Nebacumab		endotoxina
Necitumumab		EGFR
Nerelimomab		TNF- $\alpha$
Nesvacumab		angiopoyetina 2
Nimotuzumab	Theracim, Theraloc	EGFR
Nivolumab		IgG4
Nofetumomab		?
Ocaratuzumab		CD20
Ocrelizumab		CD20
Odulimomab		LFA-1 (CD11a)
Ofatumumab	Arzerra	CD20
Olaratumab		PDGF-R $\alpha$
Olokizumab		IL6
Omalizumab	Xolair	región Fc de IgE
Onartuzumab		cinasa del receptor del factor de la dispersión humana
Oportuzumab		EpCAM
Oregovomab	OvaRex	CA-125
Orticumab		oxLDL
Otelixizumab		CD3
Oxelumab		OX-40
Ozanezumab		NOGO-A
Ozoralizumab		<i>Lama glama</i>
Pagibaximab		ácido lipoteicoico
Palivizumab	Synagis, Abbosynagis	proteína F del virus respiratorio sincicial
Panitumumab	Vectibix	EGFR
Panobacumab		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Parsatuzumab		EGFL7
Pascolizumab		IL-4
Pateclizumab		LTA
Patritumab		HER3

ES 2 778 045 T3

Pemtumomab	Theragyn	MUC1
Perakizumab		IL17A
Pertuzumab	Omnitarg	HER2/neu
Pexelizumab		C5
Pidilizumab		PD-1
Pinatuzumab		CD22
Pintumomab		antígeno de adenocarcinoma
Placulumab		TNF humano
Polatuzumab		CD79B
Ponezumab		beta-amiloide humano
Priliximab		CD4
Pritoxaximab		toxina Shiga de tipo 1 de <i>E. coli</i>
Pritumumab		vimentina
PRO 140		CCR5
Quilizumab		IGHE
Racotumomab		ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico
Radretumab		dominio B extra de fibronectina
Rafivirumab		glicoproteína del virus de la rabia
Ramucirumab		VEGFR2
Ranibizumab	Lucentis	VEGF-A
Raxibacumab		toxina del ántrax, antígeno protector
Regavirumab		glicoproteína B de citomegalovirus
Reslizumab		IL-5
Rilotumumab		HGF
Rituximab	MabThera, Rituxan	CD20
Robatumumab		receptor de IGF-1
Roledumab		RHD
Romosozumab		escleroscina
Rontalizumab		IFN- $\alpha$
Rovelizumab	LeukArrest	CD11, CD18
Ruplizumab	Antova	CD154 (CD40L)
Samalizumab		CD200
Sarilumab		IL6
Satumomab		TAG-72
Secukinumab		IL-17A
Seribantumab		ERBB3
Setoxaximab		toxina Shiga de tipo 1 de <i>E. coli</i>
Sevirumab		citomegalovirus
Sibrotuzumab		FAP
Sifalimumab		IFN- $\alpha$
Siltuximab		IL-6
Simtuzumab		LOXL2
Siplizumab		CD2

ES 2 778 045 T3

Sirukumab		IL-6
Solanezumab		beta amiloide
Solitomab		EpCAM
Sonepcizumab		esfingosina-1-fosfato
Sontuzumab		episialina
Stamulumab		miostatina
Sulesomab	LeukoScan	NCA-90 (antígeno de granulocitos)
Suvizumab		VIH-1
Tabalumab		BAFF
Tacatuzumab		alfafetoproteína
Tadocizumab		integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$
Talizumab		IgE
Tanezumab		NGF
Taplitumomab		CD19
Tefibazumab	Aurexis	factor de aglutinación A
Telimomab		desconocida
Tenatumomab		tenascina C
Teneliximab		CD40
Teplizumab		CD3
Teprotumumab		CD221
TGN1412		CD28
Ticilimumab (=tremelimumab)		CTLA-4
Tigatuzumab		TRAIL-R2
Tildrakizumab		IL23
TNX-650		IL-13
Toralizumab		CD154 (CD40L)
Tositumomab	Bexxar	CD20
Tovetumab		CD140a
Tralokinumab		IL-13
Trastuzumab	Herceptin	HER2/neu
TRBS07	Ektomab	GD2
Tregalizumab		CD4
Tucotuzumab		EpCAM
Tuvirumab		virus de la hepatitis B
Ublituximab		MS4A1
Urelumab		4-1BB
Urtoxazumab		<i>Escherichia coli</i>
Ustekinumab	Stelara	IL-12, IL-23
Vantictumab		receptor de Frizzled
Vapaliximab		AOC3 (VAP-1)
Vatelizumab		ITGA2
Vedolizumab		integrina $\alpha_4\beta_7$ ,

Veltuzumab		CD20
Vepalimomab		AOC3 (VAP-1)
Vesencumab		NRP1
Visilizumab	Nuvion	CD3
Volociximab		integrina $\alpha_5\beta_1$ ,
Vorsetuzumab		CD70
Votumumab	HumaSPECT	antígeno tumoral CTAA16.88
Zalutumumab	HuMax-EGFr	EGFR
Zanolimumab	HuMax-CD4	CD4
Zatuximab		HER1
Ziralimumab		CD147 (basigina)
Zolimomab		CD5

Además de lo anterior, el anticuerpo del conjugado fármaco-anticuerpo de la presente invención puede ser Vitaxin que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento de sarcoma; Smart IDIO que es un anticuerpo humanizado anti-HLA-DR para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; Oncolym que es un anticuerpo murino radiomarcado anti-HLA-DriO para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; y Allomune que es un AcM humanizado anti-CD2 para el tratamiento de enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

5

El anticuerpo del conjugado de fármaco de la presente invención también puede ser cualquier fragmento de anticuerpo conocido para el tratamiento de cualquier enfermedad, preferiblemente cáncer. De nuevo, tales fragmentos de anticuerpo son inmunoespecíficos para un antígeno diana y pueden obtenerse comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. Los ejemplos de tales anticuerpos disponibles incluyen cualquiera de la tabla a continuación.

10

Tabla 2: fragmentos de anticuerpos monoclonales terapéuticos

Tipo/formato de fragmento	Nombre comercial	Diana
Fab/quimérico	ReoPro (abciximab)	GpIIb/gpIIa
Fab/ovino	CroFab	Veneno de serpiente
Fab/ovino	DigiFab	Digoxina
Fab/ovino	Digibind	Digoxina
Fab/ratón	CEA-scan (arcitumomab)	CEA
Fab/humanizado	Lucentis (ranibizumab; Rhu-Fab)	VEGF
Fab/humanizado	Thromboview	Dímero D
Fab/humanizado pegilado	CDP791	VEGF
Fab/humanizado pegilado	CDP870	TNF- $\alpha$
Fab/humanizado biespecífico	MDX-H210	Her2/Neu y CD64 ( $\gamma$ FcR1)
Fv de cadena sencilla (scFv)/humanizado	Pexelizumab	Complemento C5
(ScFv) <sub>4</sub> fusionado a la estreptavidina/ratón	CC49	antígeno de pancarcinoma TAG-72
ScFv fusionado a $\beta$ -lactamasa/humano	SGN-17	Antígeno P97
ScFv fusionado a PEG/humano	F5 scFv-PEG Immunoliposome	Her2
(V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) <sub>2</sub> de diacuerpo/humano	C6.5K-A	Her2/Neu
(V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) <sub>2</sub> de diacuerpo/humano	L19 L19- $\gamma$ IFN	Dominio EDB de fibronectina



(V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) <sub>2</sub> de diacuerpo/humano	T8466	CEA
(scF <sub>v</sub> -C <sub>H</sub> 3) <sub>2</sub> de minicuerpo/quimera murino-humana (minicuerpo)	T8466	CEA
Minicuerpo/quimera murino-humana (minicuerpo)	10H8	Her2
Dímero ScF <sub>v</sub> -Fc/quimera murino-humana de (ScF <sub>v</sub> ) <sub>2</sub> -Fc (minicuerpo)	T8466	CEA
(V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) de ScFv biespecífico/ratón	r28M	CD28 y MAPA
(V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) de ScFv biespecífico/origen desconocido	BiTE MT103	CD19 y CD3
(V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) de ScFv biespecífico/origen desconocido	BiTE	Ep-CAM y CD3
(V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> ) de diacuerpo en tándem biespecífico (ratón)	Tandab	CD19 y CD3
Fusión de V <sub>H</sub> H-β-lactamasa/camélido	Nanobody	CEA
Dab/humano	Anti-TNF <sub>α</sub> dAb	TNF <sub>α</sub>
V <sub>H</sub> H/camélido	Nanobody	TNF <sub>α</sub>
V <sub>H</sub> H/camélido	Nanobody	Factor de von Willebrand

(Holliger & Hudson, Nature Biotechnology, 2005, 9, 23).

En realizaciones preferidas, el anticuerpo en los conjugados de fármaco de la presente invención puede unirse a un receptor codificado por el gen ErbB. El anticuerpo puede unirse específicamente a un receptor de ErbB seleccionado de EGFR, HER2, HER3 y HER4. Preferiblemente, el anticuerpo en el conjugado de fármaco puede unirse específicamente al dominio extracelular del receptor HER2 e inhibir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan el receptor HER2. El anticuerpo del conjugado de fármaco puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado puede ser huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 o huMAb4D5-8 (trastuzumab), de manera particularmente preferible trastuzumab. El anticuerpo también puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab.

Otros anticuerpos preferidos incluyen:

- (i) anticuerpos anti-CD4. El anticuerpo del conjugado de fármaco puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado;
- (ii) anticuerpos anti-CD5. El anticuerpo del conjugado de fármaco puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado;
- (iii) anticuerpos anti-CD13. El anticuerpo del conjugado de fármaco puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado; y
- (iv) anticuerpos anti-CD20. El anticuerpo del conjugado de fármaco puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado es rituximab o un fragmento de anticuerpo del mismo, por ejemplo, un fragmento Fab.

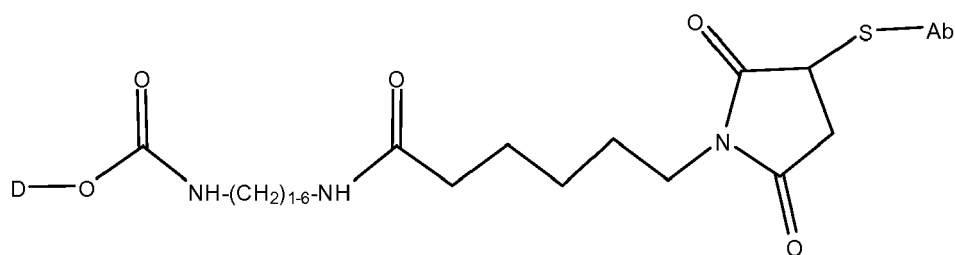
#### Procedimientos para la preparación de los conjugados fármaco-anticuerpo

Los conjugados fármaco-anticuerpo de la presente invención pueden prepararse según técnicas que son bien conocidas en la técnica. Se han descrito y ejemplificado anteriormente procedimientos para conjugar restos que comprenden al menos un anticuerpos de sitio de unión a antígeno tales como anticuerpos con varios fármacos diferentes usando diferentes procedimientos en, por ejemplo, los documentos WO-A-2004/010957, WO-A-2006/060533 y WO-A-2007/024536. Estos implican el uso de un grupo de unión que derivatiza el fármaco, la toxina o el radionúclido de tal manera que puede unirse al resto tal como un anticuerpo. La unión al resto tal como un anticuerpo es normalmente mediante una de las tres vías: a través de grupos tiol libres en cisteínas después de la reducción parcial de grupos disulfuro en el anticuerpo; a través de grupos amino libres en lisinas en el anticuerpo; y a través de grupos hidroxilo libres en serinas y/o treoninas en el anticuerpo. El método de unión varía dependiendo del sitio de unión en el resto tal como un anticuerpo. Se ha descrito también la purificación de conjugados anticuerpo-fármaco mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) [véanse, por ejemplo, Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Set (USA), 93: 8618-8623 (1996), y Chari *et al.*, Cancer Research, 52: 127-131 (1992)].

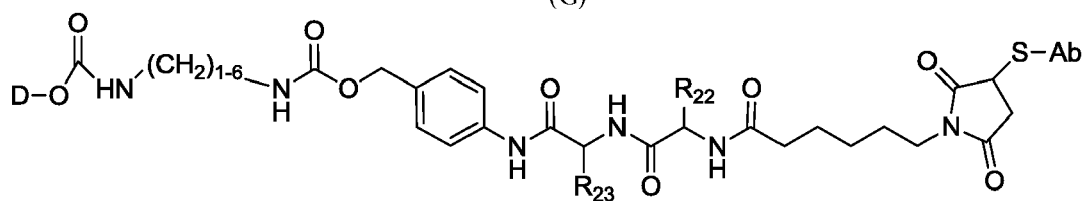
Tal como se ha observado previamente, las cargas útiles del fármaco de los conjugados de fármaco de la presente invención son derivados de dihidropiran-2-ona y tetrahidropiran-2-ona que se han dado a conocer o están dentro del alcance de las publicaciones internacionales n.ºs WO-A-2007/144423 y WO-A-2009/080761. Estos compuestos se sintetizan según los procedimientos descritos y ejemplificados en estas solicitudes internacionales.

- 5 Además, se describe en el presente documento un procedimiento para la preparación de un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención que comprende conjugar un resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y un fármaco D de fórmula (Ia) o (Ib), siendo Ab y D tal como se definen en el primer aspecto de la presente invención.

- 10 Un ejemplo de un procedimiento para la preparación de un conjugado de fármaco de la presente invención implica la preparación de conjugados fármaco-anticuerpo de fórmula (G) o (H) de la presente invención de la siguiente manera:



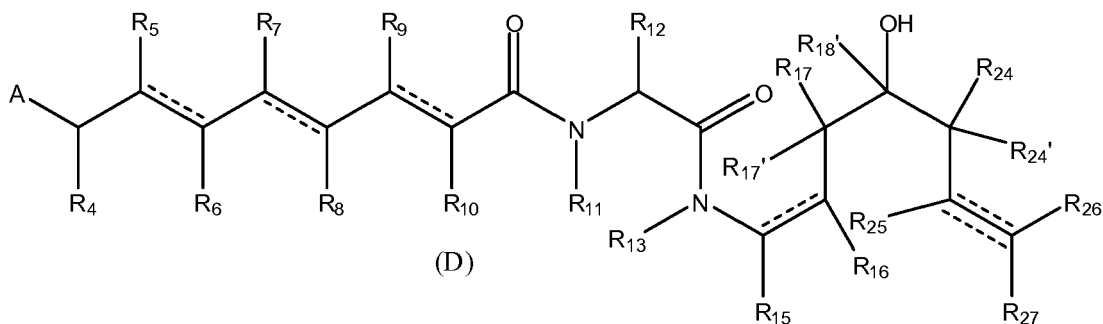
(G)



(H)

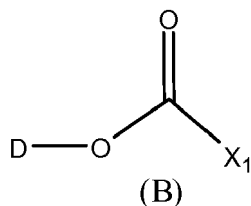
comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 15 (i) hacer reaccionar un fármaco (D) de fórmula (Ia)-H:



(D)

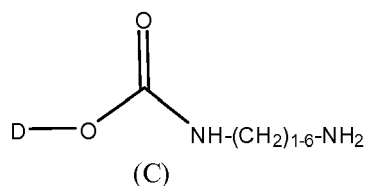
en el que los sustituyentes en las definiciones de (Ia) son tal como se definieron anteriormente, con un compuesto de fórmula  $X_2-C(O)-X_1$  en la que  $X_1$  y  $X_2$  son grupos salientes para dar un compuesto de fórmula (B):



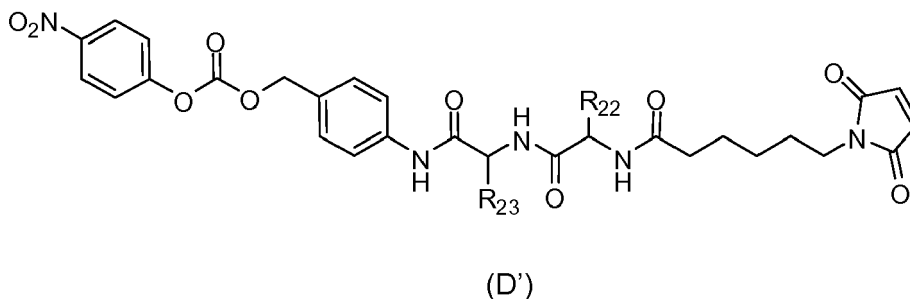
(B)

- 20 y el punto de unión del resto  $-(C=O)X_1$  es el grupo hidroxilo libre unido al mismo carbono que  $R_{18}$ .  
 (ii) Hacer reaccionar el compuesto de fórmula (B) producido en la etapa (i) con una diamina de fórmula

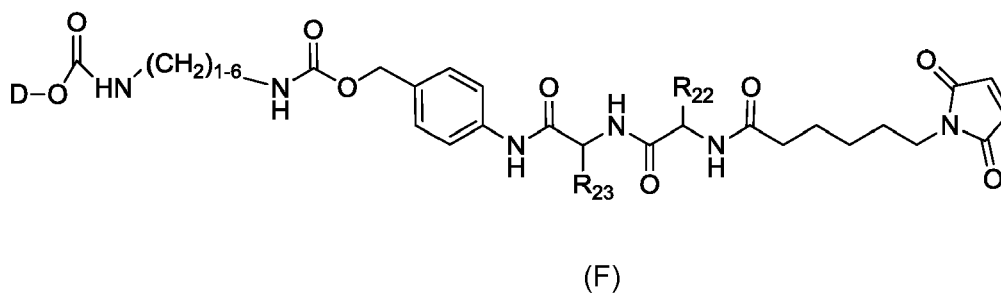
H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>NH<sub>2</sub> para dar un compuesto de fórmula (C):



(iii) o bien hacer reaccionar el compuesto de fórmula (C) producido en la etapa (ii) con un compuesto de fórmula (D'):

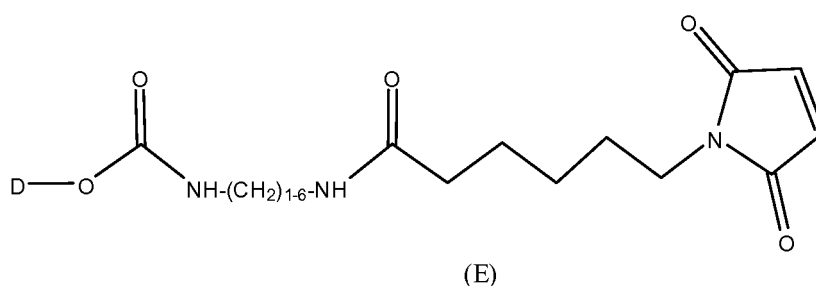


5 para dar un compuesto de fórmula (F):

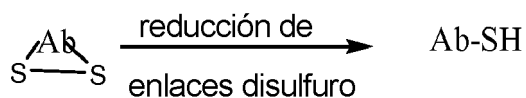


o bien

hacer reaccionar el compuesto (C) producido en la etapa (ii) con éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimidohexanoico para dar (E):



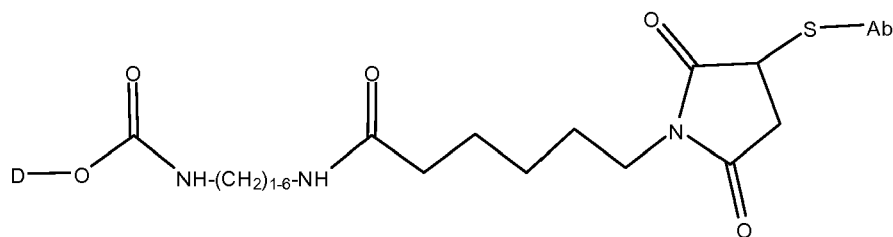
10 (iv) reducción parcial de uno o más enlaces disulfuro en el anticuerpo que va a conjugarse para dar un anticuerpo Ab-SH reducido que tiene grupos tiol libres:



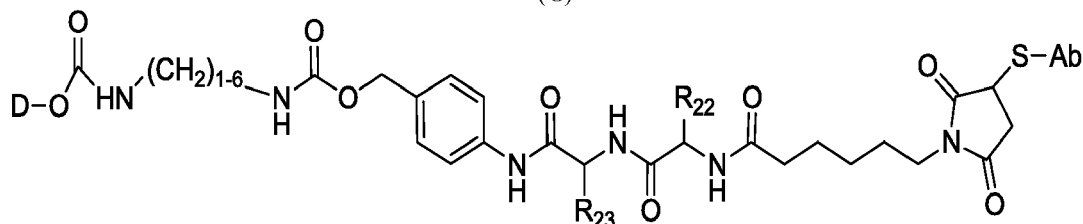
¡y

(v) reacción del anticuerpo Ab-SH parcialmente reducido que tiene grupos tiol libres con el compuesto de fórmula (E) o (F) producido en la etapa (iv) para dar el conjugado fármaco-anticuerpo deseado de fórmula (G) o (H) respectivamente:

15



(G)



(H)

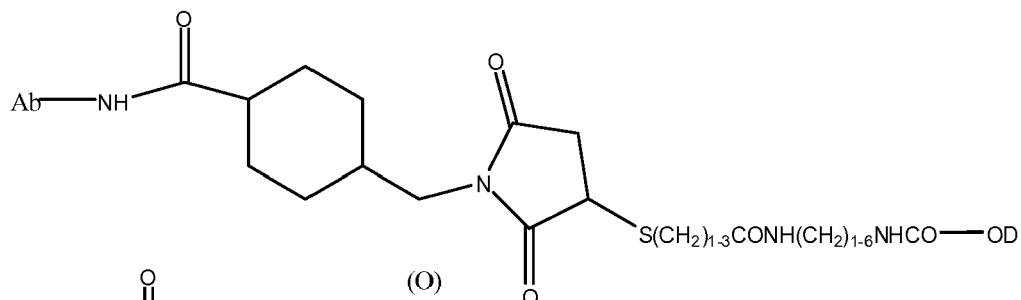
Preferiblemente, el compuesto de fórmula  $X_2-C(O)-X_1$  que se ha hecho reaccionar con el fármaco (A) en la etapa (i) es 1,1'-carbonildiimidazol.

- 5 Preferiblemente, la diamina en la etapa (ii) tiene la fórmula  $NH_2-(CH_2)_{2-4}-NH_2$ , y más preferiblemente es propilen-1,3-diamina.

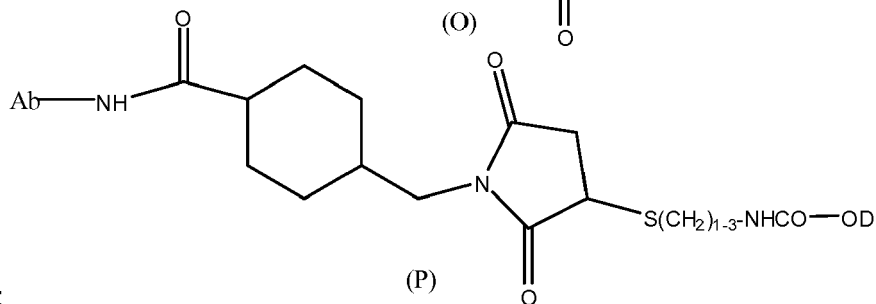
En una realización preferida de este procedimiento, el producto intermedio (C) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (D') en la que  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3-NH-CO-NH_2$  y  $R_{22}$  es isopropilo.

- 10 En otra realización preferida de este procedimiento, el anticuerpo se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, o se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa de los mismos; o se selecciona de un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13, o una porción inmunológicamente activa de los mismos, y lo más preferiblemente es un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo. Además, la reducción parcial de este anticuerpo monoclonal se realiza usando clorhidrato de tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP).

Otro ejemplo de un procedimiento para la preparación de un conjugado fármaco-anticuerpo de la presente invención, implica la preparación de conjugados fármaco-anticuerpo de fórmula (O) o (P) de la siguiente manera



(O)

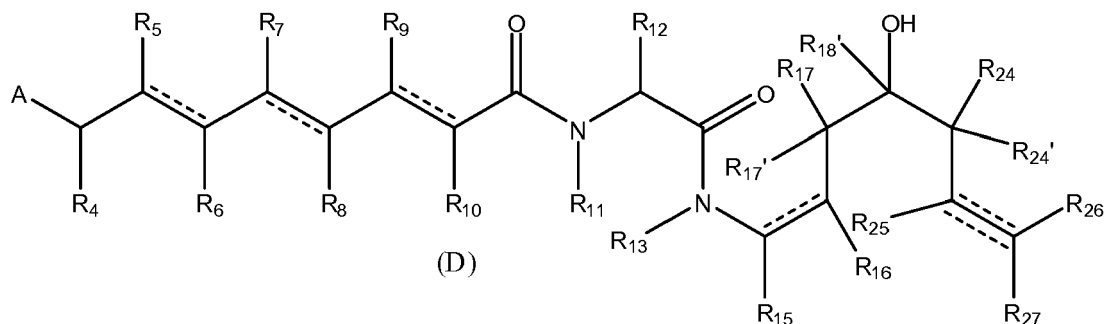


(P)

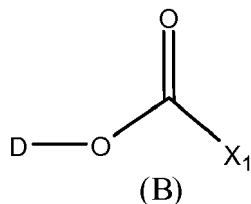
- 20 comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

(i) además:

hacer reaccionar un fármaco (D) de fórmula (Ia)-H:

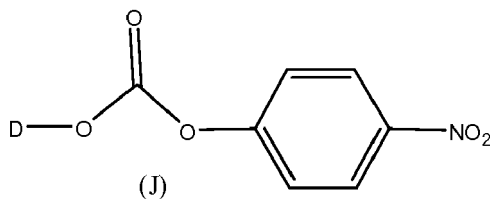


5 en el que los sustituyentes en las definiciones de (Ia)-H son tal como se definieron anteriormente, con un compuesto de fórmula  $X_2-C(O)-X_1$  en la que  $X_1$  y  $X_2$  son grupos salientes para dar un compuesto de fórmula (B):



y el punto de unión del resto  $X_1(CO)$  es el grupo hidroxilo libre unido al mismo átomo de carbono que  $R_{18}$ , o

(b) hacer reaccionar dicho fármaco (A) de fórmula (Ia)-H tal como se definió anteriormente con 4-nitrofenilcloroformiato para dar un compuesto de fórmula (J):

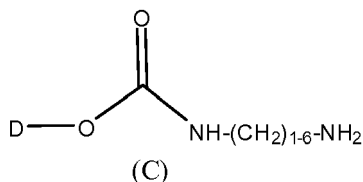


10

y el punto de unión del grupo (4-nitrofenil)-O-CO- es el mismo que para el resto  $X_1(CO)$  en (a) anteriormente;

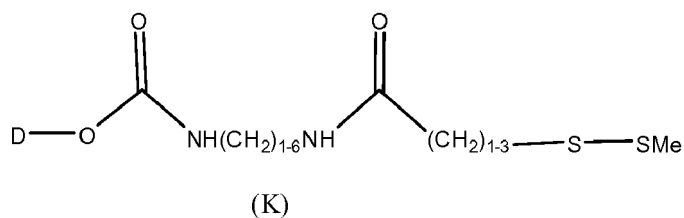
(ii) o bien:

(c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (B) producido en la etapa (i) con una diamina de fórmula  $H_2N-(CH_2)_{1-6}NH_2$  para dar un compuesto de fórmula (C):



15

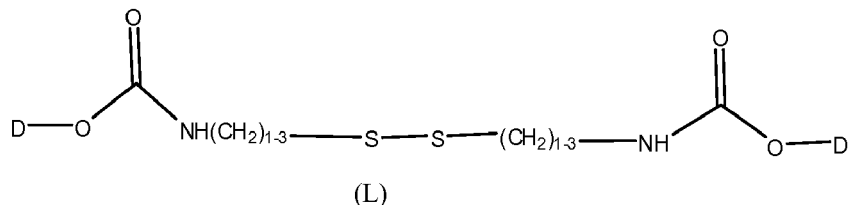
y luego hacer reaccionar el compuesto resultante de fórmula (C) con un compuesto de fórmula  $Me-S-S-(CH_2)_{1-3}-CO_2H$  para dar un compuesto de fórmula (K)



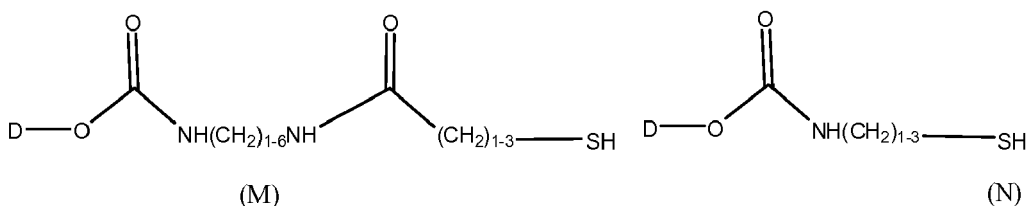
o bien

(d) hacer reaccionar el compuesto (J) producido en la etapa (i) con un compuesto de aminoalquiltio de fórmula  $H_2N-$

(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>SH para dar un compuesto de fórmula (L):

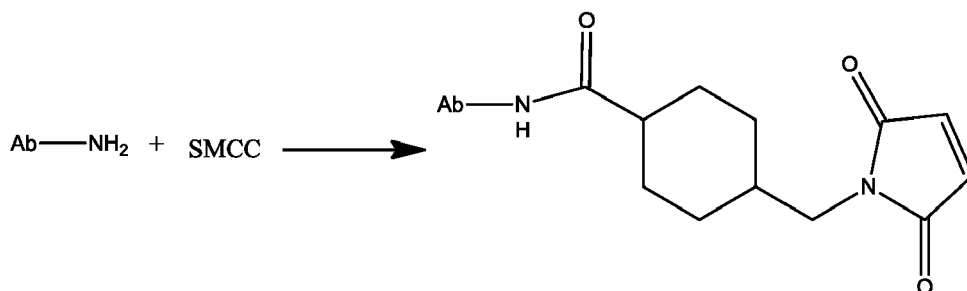


(iii) hacer reaccionar (K) o (L) producidos en la etapa (ii) con ditiotretol en condiciones reductoras de disulfuro para dar compuestos de fórmula (M) y (N) respectivamente:

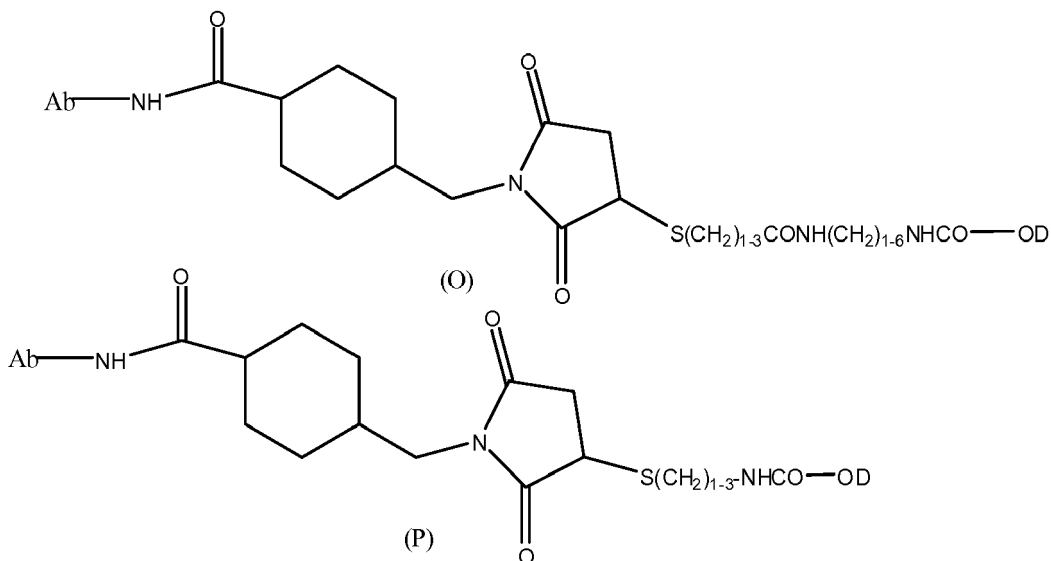


5

(iv) hacer reaccionar el anticuerpo que va a conjugarse con 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo para derivatizar dicho anticuerpo en uno o más grupos lisina con un grupo succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carbonilo:



10 (v) hacer reaccionar el anticuerpo derivatizado producido en la etapa (iv) con o bien (M) o bien (N) producidos en la etapa (iii) para dar el conjugado fármaco-anticuerpo deseado de fórmula (O) o (P):



15 Como para el procedimiento anterior, el compuesto de fórmula X<sub>2</sub>-C(O)-X<sub>1</sub> es preferiblemente 1,1'-carbonildiimidazol. De manera similar, el compuesto de diamina de fórmula (B) es preferiblemente NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-NH<sub>2</sub>, y más preferiblemente propileno-1,3-diamina.

Preferiblemente, el compuesto que se ha hecho reaccionar con el compuesto de fórmula (C) para dar el compuesto de fórmula (K) es ácido 3-(metildisulfanil)propanoico.

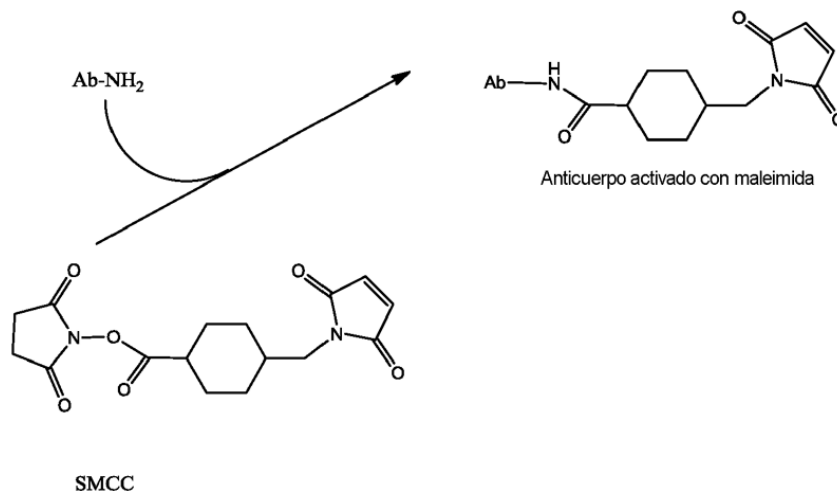
Alternativamente, el compuesto de aminoalquiltio que se hace reaccionar con un compuesto de fórmula (J) para dar un compuesto de fórmula (L) es 3-aminopropano-1-tiol.

Cuando la unión al resto del grupo de unión del fármaco es a través de grupos tiol libres en cisteínas después de la reducción parcial de grupos disulfuro en el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno tal como un anticuerpo monoclonal, la reducción parcial se realiza normalmente diluyendo en primer lugar hasta una concentración adecuada y tamponando la disolución antes de la reducción parcial de los enlaces disulfuro por medio de la adición de un agente reductor adecuado tal como clorhidrato de tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP) o ditioneitol (DTT). Eligiendo las razones apropiadas del resto que va a reducirse tal como un anticuerpo monoclonal y el agente reductor, las condiciones de reacción y el tiempo de la reducción es posible obtener una razón de tiol libre con respecto al resto deseada, por ejemplo, cuatro grupos tiol libres por anticuerpo monoclonal.

El resto parcialmente reducido tal como el anticuerpo monoclonal parcialmente reducido que tiene los grupos tiol libres, preparado tal como se describió anteriormente, se hace reaccionar luego con compuestos fármaco-grupo de unión de la invención de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> (en la que el grupo L en tal compuesto es un grupo maleimida que es libre para reaccionar con los grupos tiol). Los conjugados fármaco-anticuerpo resultantes se purifican mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) [véanse, por ejemplo, Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Set (EE.UU.), 93: 8618-8623 (1996), y Chari *et al.*, Cancer Research, 52: 127-131 (1992)].

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal parcialmente reducido es trastuzumab o un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos, preferiblemente trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo; o preferiblemente un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa del mismo.

Alternativamente, en primer lugar, pueden hacerse reaccionar las lisinas en el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno tal como un anticuerpo monoclonal con 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo. Un grupo amina libre en un anticuerpo puede reaccionar con el éster de N-hidroxisuccinimida para dar un anticuerpo activado con maleimida:



El anticuerpo activado con maleimida puede hacerse reaccionar luego con un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H que tiene un resto de tiol reactivo.

Dos ejemplos específicos de procedimientos para la preparación de conjugados fármaco-anticuerpo de fórmula [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab de la presente invención mediante conjugación a través de grupos tiol libres en cisteínas después de la reducción parcial de grupos disulfuro en el anticuerpo y a través de grupos amino libres en lisinas en el anticuerpo tras la activación con un grupo maleimida se muestran en las figuras 1 y 2.

#### Composiciones que comprenden el conjugado fármaco-anticuerpo de la invención y usos de las mismas

En el quinto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco según la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la forma de administración de un conjugado de fármaco que tiene la fórmula general [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)]<sub>n</sub>-Ab de la presente invención incluye sin limitación oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía parenteral. Pueden formularse composiciones farmacéuticas de la invención de manera que permitan que un conjugado de fármaco de la presente invención esté biodisponible tras la administración de la composición a un animal, preferiblemente un ser humano. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un comprimido puede ser una única unidad de dosificación, y un envase de un conjugado fármaco-anticuerpo de la

presente invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

El portador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser material particulado, de manera que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimido o polvo. El/los portador(es) puede(n) ser líquido(s), siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el/los portador(es) puede(n) ser gaseoso(s), para proporcionar una composición en aerosol útil en, por ejemplo, administración por vía inhalatoria. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un conjugado fármaco-anticuerpo de la presente invención. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. Los portadores pueden ser solución salina, goma arábica, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal y urea. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administran a un animal, los conjugados fármaco-anticuerpo de la presente invención o las composiciones y los portadores farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un portador preferido cuando los conjugados fármaco-anticuerpo de la presente invención se administran por vía intravenosa. Pueden emplearse también soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o de emulsificación o agentes de tamponamiento del pH.

Cuando se destina a la administración oral, la composición está preferiblemente en forma sólida o líquida, en las que se incluyen formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y de gel dentro de las formas consideradas en el presente documento como o bien sólidas o bien líquidas.

Como composición sólida para administración oral, la composición puede formularse en un polvo, un gránulo, comprimido fabricado por compresión, una píldora, una cápsula, un chicle, una oblea o forma similar. Una composición sólida de este tipo contiene normalmente uno o más diluyentes inertes. Además, puede presentarse uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio y almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio; agentes deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o aromatizante de naranja; y un agente colorante.

Cuando la composición está en forma de una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para administrar por inyección. Cuando se destina a administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición para administración por inyección, también puede incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente de dispersión, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

La vía preferida de administración es administración parenteral incluyendo intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, intranasal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal o transdérmica. El modo preferido de administración se deja a la discreción del médico, y dependerá en parte del sitio del estado médico (tal como el sitio del cáncer). En una realización más preferida, los presentes conjugados fármaco-anticuerpo de la presente invención se administran por vía intravenosa.

Las composiciones líquidas de la invención, ya sean disoluciones o suspensiones, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos, polietilenglicoles, glicerina u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; y agentes para el ajuste la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede incluirse en una ampolla, una jeringa desechable o un vial de dosis múltiples fabricado de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido.

La cantidad del conjugado de fármaco de la presente invención que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o estado particular dependerá de la naturaleza del trastorno o estado, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, puede emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de fármaco de la presente invención de



manera que se obtendrá una dosificación adecuada. La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación y su sitio particular, el huésped y la enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, cáncer y, en ese caso, qué tipo de tumor. Deberán tenerse en cuenta otros factores como la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la tasa de excreción, el estado del huésped, las combinaciones de fármacos, hipersensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. La administración puede llevarse a cabo de manera continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

Normalmente, esta cantidad es de al menos aproximadamente el 0,01% de un conjugado de fármaco de la presente invención en peso de la composición. Cuando se destina a administración oral, esta cantidad puede variarse para oscilar entre aproximadamente el 0,1% y aproximadamente el 80% en peso de la composición. Las composiciones orales preferidas pueden comprender desde aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 50% del conjugado de fármaco de la presente invención en peso de la composición. Las composiciones preferidas de la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contiene desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 2% en peso del conjugado de fármaco de la presente invención.

Para administración intravenosa, la composición puede comprender desde de manera aproximada normalmente de manera aproximada 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal, preferiblemente, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

El conjugado de fármaco de la presente invención o las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de endotelios epiteliales o mucocutáneos.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más conjugados de fármaco de la presente invención o composiciones de manera local en el área que necesita el tratamiento. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmunitaria.

La administración por vía pulmonar puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de dispersión en forma de aerosol, o a través de perfusión en un fluorocarbono o un tensoactivo pulmonar sintético. En determinadas realizaciones, el conjugado fármaco-anticuerpo de la presente invención o las composiciones pueden formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizadores o suspensiones. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición que pretende administrarse por inyección puede prepararse combinando un conjugado de fármaco de la presente invención con agua de manera que se forme una disolución. Puede añadirse un tensoactivo para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea.

Se ha encontrado que los conjugados de fármaco y las composiciones de la presente invención son particularmente eficaces en el tratamiento de cáncer.

El cuarto aspecto de la presente invención proporciona un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma y cáncer de ovario.

Los conjugados de fármaco y las composiciones de la presente invención son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, o para tratar un cáncer en un animal. Los conjugados de fármaco y las composiciones de la presente invención pueden usarse por consiguiente en una variedad de entornos para el tratamiento de cánceres en animales. Los conjugados de la invención que comprenden un resto de fármaco-grupo de unión que comprende al menos un sitio de unión a antígeno pueden usarse para administrar un fármaco o una unidad de fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin limitarse a la teoría, en una realización, el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno de un conjugado de fármaco de la presente invención se une o se asocia con un antígeno asociado a una célula cancerosa o una célula tumoral, y el conjugado de fármaco de la presente invención puede llevarse al interior de una célula tumoral o célula cancerosa a través de la endocitosis mediada por receptores. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas dentro de la unidad del grupo de unión se escinden de manera hidrolítica mediante una o más proteasas o hidrolasas asociadas a células tumorales o células cancerosas, dando como resultado la liberación de un fármaco o un compuesto de fármaco-grupo de unión. El fármaco o compuesto de fármaco-grupo de unión

liberado es entonces libre para migrar en la célula e inducir actividades citotóxicas. En una realización alternativa, el fármaco o unidad de fármaco se escinde del conjugado de fármaco de la presente invención fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el fármaco o compuesto de fármaco-grupo de unión penetra posteriormente en la célula.

- 5 En una realización, el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se une a la célula tumoral o célula cancerosa. En otra realización, el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se une a un antígeno de células tumorales o células cancerosas que está en la superficie de la célula tumoral o la célula cancerosa. En aún otra realización, el resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se une a un antígeno de células tumorales o células cancerosas que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o la
- 10 célula cancerosa.

La especificidad del resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno para una célula tumoral o célula cancerosa particular puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de manera más eficaz. Por ejemplo, conjugados de fármaco de la presente invención que tienen una unidad de trastuzumab pueden ser útiles para tratar carcinomas positivos para antígenos incluyendo leucemias, cáncer de pulmón, cáncer de colon, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin), tumores sólidos tales como, sarcoma y carcinomas, mieloma múltiple, cáncer de riñón y melanoma. El cáncer puede ser preferiblemente cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma o

15 cáncer de ovario. Por ejemplo, los conjugados de fármaco de la presente invención que tienen una unidad de rituximab pueden ser útiles para tratar tumores que expresan CD-20 tales como cánceres hemáticos incluyendo leucemias y linfomas. Por ejemplo, conjugados de fármaco de la presente invención que tienen una unidad de anticuerpo anti-CD4 pueden ser útiles para tratar tumores que expresan CD-4 tales como cánceres hemáticos incluyendo linfomas. Por ejemplo, conjugados de fármaco de la presente invención que tienen una unidad de anticuerpo anti-CD5 pueden ser útiles para tratar tumores que expresan CD-5 tales como cánceres hemáticos incluyendo leucemias y linfomas. Por ejemplo, los conjugados de fármaco de la presente invención que tienen una

20 unidad de anticuerpo anti-CD13 pueden ser útiles para tratar tumores que expresan CD-13 tales como cánceres hemáticos incluyendo leucemias y linfomas.

Otros tipos particulares de cánceres que pueden tratarse con conjugados de fármaco de la presente invención incluyen: cánceres de transmisión hemática incluyendo todas las formas de leucemia; linfomas, tales como enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple.

- 30 En particular, los conjugados de fármaco y las composiciones de la presente invención muestran una actividad excelente en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma y cáncer de ovario.

Los conjugados de fármaco y composiciones de la presente invención proporcionan conjugación específica de tumores o selección como diana de cáncer, reduciéndose así la toxicidad general de estos conjugados. Las

35 unidades del grupo de unión estabilizan los conjugados fármaco-anticuerpo en la sangre, aún pueden escindirse por proteasas e hidrolasas específicas de tumores dentro de la célula, liberando un fármaco.

Los conjugados de fármaco y las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un animal que también se han sometido a una intervención quirúrgica como tratamiento para el cáncer. En una realización de la presente invención, el método adicional de tratamiento es radioterapia.

- 40 En una realización específica de la presente invención, el conjugado de fármaco o la composición de la presente invención se administra de manera concurrente y con un agente quimioterápico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterápico o la radioterapia se administra antes o después de la administración de un conjugado de fármaco o una composición de la presente invención, preferiblemente al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, más preferiblemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses),
- 45 antes o después de la administración de un conjugado fármaco-anticuerpo o una composición de la presente invención.

Un agente quimioterápico puede administrarse a lo largo de una serie de sesiones, puede administrarse uno cualquiera o una combinación de agentes quimioterápicos conocidos en la técnica.

- 50 Con respecto a la radiación, puede usarse cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del tipo de cáncer que va a tratarse. Por ejemplo, pero a modo de limitación, puede administrarse radiación de rayos X; en particular, puede usarse megavoltaje de alta energía (radiación de más de 1 MeV de energía) para tumores profundos, y puede usarse un haz de electrones y radiación de rayos X de ortovoltaje para cánceres de piel. Pueden administrarse también radioisótopos que emiten rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

Además, se describe en el presente documento un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fármaco según el primer aspecto de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

55

Preferiblemente, el kit es para su uso en el tratamiento de cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma

múltiple, linfoma y cáncer de ovario.

**Breve descripción de los dibujos**

La invención se ilustra de manera esquemática, a modo de ejemplo, en los dibujos adjuntos en los que:

- 5     La figura 1 es una ilustración esquemática de un procedimiento en el que la conjugación con el anticuerpo es a través de grupos tiol libres;
- la figura 2 es una ilustración esquemática de otro procedimiento en el que la conjugación con el anticuerpo es a través de grupos lisina libres;
- la figura 3 es una curvas de respuesta a la dosis representativa para ADC1 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 10    la figura 4 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC1 a 10 ó 1 µg/ml;
- la figura 5 es una curvas de respuesta a la dosis representativa para ADC2 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 15    la figura 6 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC2 a 10 ó 1 µg/ml;
- la figura 7 es una curvas de respuesta a la dosis representativa para ADC3 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 8 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC3 a 10 ó 1 µg/ml;
- 20    la figura 9 es una curvas de respuesta a la dosis representativa para ADC4 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 10 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC4 a 10 ó 1 µg/ml;
- 25    la figura 11 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC5 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 12 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC5 a 10 ó 1 µg/ml;
- la figura 13 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC6 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 30    la figura 14 muestra histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC6 a 10 ó 1 µg/ml;
- la figura 15 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC7 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 35    la figura 16 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC7 a 50 ó 1 µg/ml;
- la figura 17 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC8 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 18 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC8 a 50 ó 10 µg/ml;
- 40    la figura 19 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC9 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 20 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC9 a 50 ó 0,1 µg/ml;
- 45    la figura 21 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC10 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 22 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las

- diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC10 a 50 ó 1 µg/ml;
- la figura 23 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC11 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 5 la figura 24 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC11 a 50 ó 1 µg/ml;
- la figura 25 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC12 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 26 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC12 a 1 ó 0,1 µg/ml;
- 10 la figura 27 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC13 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 28 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC13 a 1 ó 0,1 µg/ml;
- la figura 29 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC14 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 15 la figura 30 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC14 a 1 µg/ml;
- la figura 31 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC16 contra diversas líneas de células cancerosas;
- 20 la figura 32 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC16 a 1 µg/ml y 0,1 µg/ml;
- la figura 33 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC17 contra diversas líneas de células cancerosas;
- la figura 34 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC17 a 1 µg/ml y 0,1 µg/ml;
- 25 la figura 35 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC14 contra dos clones de células Raji;
- la figura 36 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC14 a 10 µg/ml;
- la figura 37 es una curvas de respuesta a la dosis representativa de ADC15 contra dos clones de células Raji; y
- 30 la figura 38 muestra histogramas que muestran el porcentaje de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC15 a 10 µg/ml.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. En los ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas:

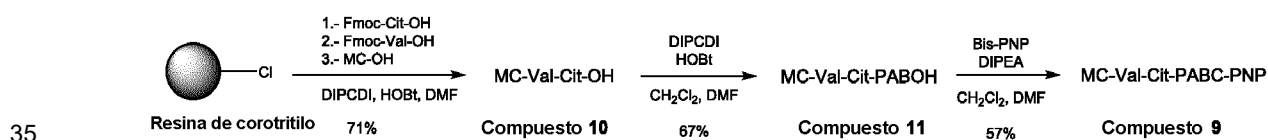
- 35 CDI, 1,1'-carbonildiimidazol
- DIPEA, diisopropiletilamina
- Hex, hexano
- EtOAc, acetato de etilo
- DCM, diclorometano
- 40 NMP, *N*-metil-2-pirrolidona
- DMF, dimetilformamida
- EDC, clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida
- EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

- MeOH, metanol  
 DTT, ditioneitol  
 Py, piridina  
 THF, tetrahidrofurano
- 5 TCEP, clorhidrato de Tris[2-carboxietil]fosfina  
 MC, 6-maleimidocaproílo  
 Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo  
 Cit, citrulina  
 Val, valina
- 10 DMSO, dimetilsulfóxido  
 Trt, trifenilmetilo  
 HOBt, 1-hidroxibenzotriazol  
 DIPCDI, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida  
 TFA, ácido trifluoroacético
- 15 PABOH, alcohol 4-aminobencílico  
 bis-PNP, bis(4-nitrofenil)carbonato  
 NAC, *N*-acetilcisteína  
 SEC, cromatografía de exclusión molecular  
 HPLC, cromatografía de líquidos de alto rendimiento
- 20 ADC, conjugado anticuerpo-fármaco  
 ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo  
 DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco  
 RPMI, medio Roswell Park Memorial Institute  
 ITS, suplemento de los medios de insulina-transferrina-selenita de sodio
- 25 FCS, suero bovino fetal  
 SRB, sulforodamina B  
 PBS, solución salina tamponada con fosfato  
 DR, respuesta a la dosis  
 UV, ultravioleta
- 30 SMCC, succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato  
 LAR, razón grupo de unión con respecto a anticuerpo

Ejemplo preparativo

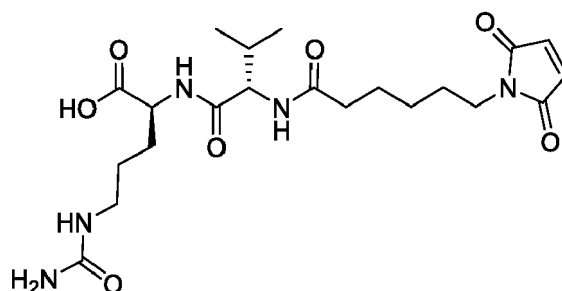
Preparación del compuesto 9: MC-Val-Cit-PABC-PNP

Esquema de reacción



## (a) Preparación del compuesto 10: MC-Val-Cit-OH

## Compuesto 10



5 Se colocó resina de Cl-TrtCl (20 g, 1,49 mmol/g) (Iris Biotech, ref.: BR-1065, resina de cloruro de 2-clorotritilo (200-400 de malla, DVB al 1%, 1,0-1,6 mmol/g), CAS 42074-68-0) en una placa de filtro. Se añadió 100 ml de DCM a la resina y se agitó la mezcla durante 1 h. Se eliminó el disolvente mediante filtración a vacío. Se añadió una disolución de Fmoc-Cit-OH (11,83 g, 29,78 mmol) y DIPEA (17,15 ml, 98,45 mmol) en DCM (80 ml) y se agitó la mezcla durante 10 min. Después de eso se añadió DIPEA (34,82 mmol, 199,98 mmol) y se agitó la mezcla durante 1 h. Se terminó la reacción mediante la adición de MeOH (30 ml) después de agitar durante 15 minutos. La resina de Fmoc-Cit-O-TrtCl producida como resultado se sometió al/a los siguiente/s lavado/tratamientos: DCM (5 x 50 ml x 0,5 min), DMF (5 x 50 ml x 0,5 min), piperidina:DMF (1:4, 1 x 1 min, 2 x 10 min), DMF (5 x 50 ml x 0,5 min), DCM (5 x 50 ml x 0,5 min). El lavado con piperidina final proporcionó resina de NH<sub>2</sub>-Cit-O-TrtCl. Se calculó la carga: 1,15 mmol/g.

15 La resina de NH<sub>2</sub>-Cit-O-TrtCl producida anteriormente se lavó con DMF (5 x 50 ml x 0,5 min) y se añadió una disolución de Fmoc-Val-OH (31,22 g, 91,98 mmol), HOBT (11,23 g, 91,98 mmol) en DMF (100 ml) a la resina de NH<sub>2</sub>-Cit-O-TrtCl, se agitó y se añadió DIPCDI (14,24 ml, 91,98 mmol) y se agitó la mezcla durante 1,5 h. Se terminó la reacción mediante lavado con DMF (5 x 50 ml x 0,5 min). La resina de Fmoc-Val-Cit-O-TrtCl así producida se trató con piperidina:DMF (1:4, 1 x 1 min, 2 x 10 min) y se lavó con DMF (5 x 50 ml x 0,5 min). El lavado con piperidina final proporcionó resina de NH<sub>2</sub>-Val-Cit-O-TrtCl.

20 Se añadió una disolución de ácido 6-maleimidocaproico (MC-OH) (9,7 g, 45,92 mmol), HOBT (6,21 g, 45,92 mmol) en DMF (100 ml) a la resina de NH<sub>2</sub>-Val-Cit-O-TrtCl producida anteriormente, se agitó y se añadió DIPCDI (7,12 ml, 45,92 mmol) y se agitó la mezcla durante 1,5 h. Se terminó la reacción mediante lavado con DMF (5 x 50 ml x 0,5 min) y DCM (5 x 50 ml x 0,5 min).

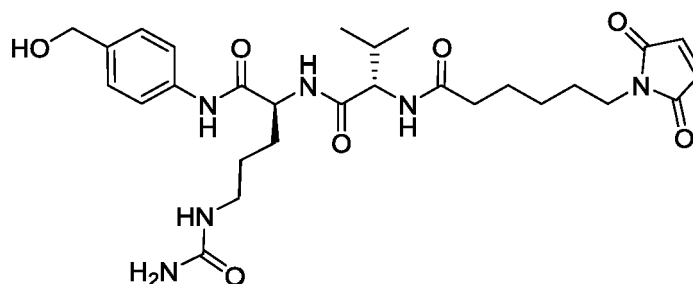
25 El péptido se escindió de la resina mediante tratamientos con TFA:DCM (1:99, 5 x 100 ml). La resina se lavó con DCM (7 x 50 ml x 0,5 min). Se evaporaron los filtrados combinados hasta sequedad a presión reducida y se trituró el sólido obtenido con Et<sub>2</sub>O y se filtró para obtener el compuesto 10 (7,60 g, 71%) como un sólido blanco.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12,47 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,74 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,99 (s, 2H), 5,93 (s, 1H), 5,35 (s, 2H), 4,20 (dd, *J* = 9,0, 6,8 Hz, 1H), 4,15-4,07 (m, 1H), 3,36 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,00-2,88 (m, 2H), 2,21-2,12 (m, 1H), 2,11-2,03 (m, 1H), 1,98-1,86 (m, 1H), 1,74-1,62 (m, 1H), 1,61-1,50 (m, 1H), 1,50-1,31 (m, 6H), 1,21-1,11 (m, 2H), 0,84 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,80 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

30 ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 467,2. Encontrado: 468,3 (M+H)<sup>+</sup>.

## (b) Preparación del compuesto 11: MC-Val-Cit-PABOH

## Compuesto 11



35 A una disolución del compuesto 10 (1,6 g, 3,42 mmol) y alcohol 4-aminobencílico (PABOH) (0,84 g, 6,84 mmol) en DCM (60 ml) se le añadió una disolución de HOBT (0,92 g, 6,84 mmol) en DMF (5 ml). Se añadió DIPCDI (1,05 ml, 6,84 mmol), se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a 23°C, se añadió Et<sub>2</sub>O (150 ml) y se filtró el sólido obtenido en una placa de filtro a vacío para obtener el compuesto 11 (1,31 g, 67%).

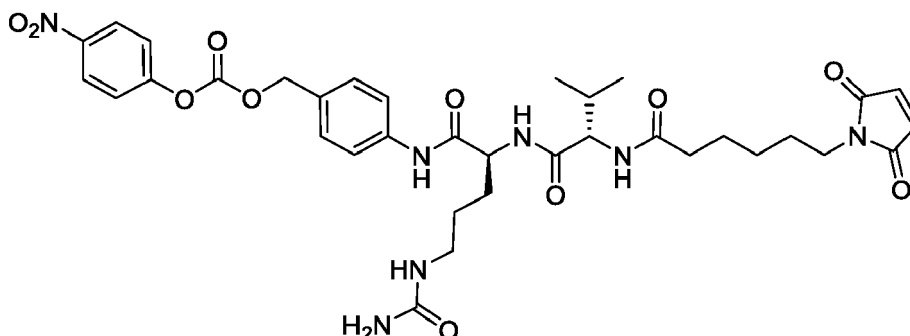
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*6): δ 9,88 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,77 (dd, *J* = 12,2, 8,5 Hz, 1H), 7,53 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,99 (s, 3H), 6,01-5,92 (m, 1H), 5,39 (s, 2H), 5,07 (s, 1H), 4,41 (s, 2H), 4,39-4,31 (m, 1H), 4,23-4,12 (m, 1H), 3,36 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,96-2,90 (m, 1H), 2,22-2,03 (m, 2H), 2,01-1,88 (m, 1H), 1,76-1,62 (m, 1H), 1,63-1,28 (m, 6H), 1,25-1,11 (m, 2H), 0,84 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0,81 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

5

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>: 572,3. Encontrado: 573,3 (M+H)<sup>+</sup>.

(c) Preparación del compuesto 9: MC-Val-Cit-PAB-PNP

Compuesto 9



10 A una disolución del compuesto 11 (500 mg, 0,87 mmol) y bis(4-nitrofenil) carbonato (bis-PNP) (2,64 g, 8,72 mmol) en DCM:DMF (8:2, 25 ml) se le añadió DIPEA (0,45 ml, 2,61 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 20 h a 23°C y se vertió sobre una columna de gel de sílice (DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 50:1 hasta 10:1) para dar el compuesto 9 objetivo puro (364 mg, 57%).

R<sub>f</sub> = 0,40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH, 9:1).

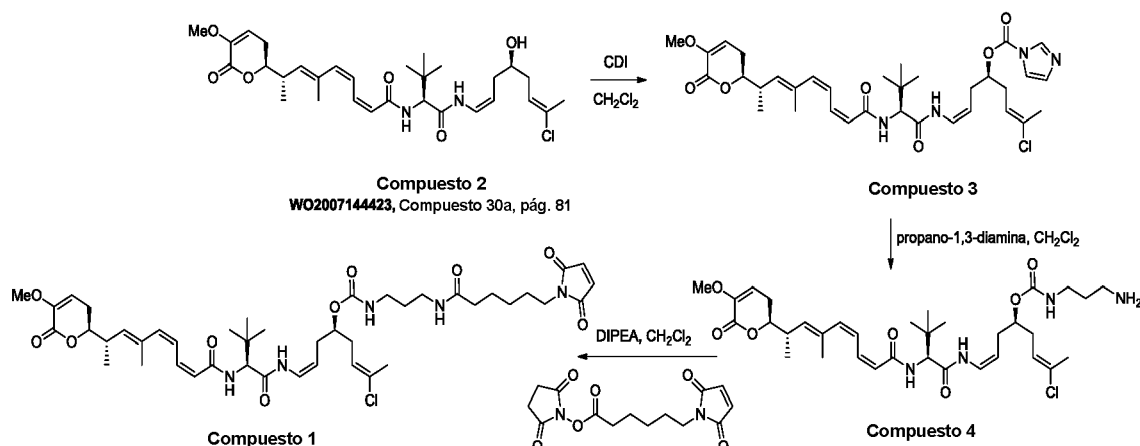
15 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD): δ 9,45 (s, 1H), 8,23 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,59 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,35 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,65 (s, 2H), 5,20 (s, 2H), 4,56 (dt, *J* = 10,5, 5,4 Hz, 1H), 4,15 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,46 (dd, *J* = 8,0, 6,4 Hz, 2H), 3,16-2,89 (m, 2H), 2,21 (dd, *J* = 8,3, 6,6 Hz, 2H), 2,06-1,97 (m, 1H), 1,90-1,83 (m, 1H), 1,73-1,46 (m, 7H), 1,34-1,20 (m, 2H), 0,91 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 0,90 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H).

20 <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ 174,4, 172,4, 171,1, 170,6, 160,5, 155,5, 152,5, 145,3, 138,7, 134,1, 129,9, 129,5, 125,2, 121,8, 120,0, 70,6, 59,0, 53,2, 37,5, 35,8, 30,6, 29,6, 29,3, 28,1, 26,2, 26,2, 25,1, 19,1, 18,1.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>: 737,3. Encontrado: 738,3 (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 1

Preparación del compuesto 1



25 (a) Preparación del compuesto 3

A una disolución del compuesto 2 (compuesto 30a, preparado tal como se describe en el documento WO 2007144423) (1,014 g, 1,8 mmol) en DCM (45 ml) se le añadió 1,1'-carbonildiimidazol (876 mg, 5,4 mmol). Después de agitarse a 23°C durante la noche, se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se purificó el residuo obtenido en

## ES 2 778 045 T3

un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc, desde 99:1 hasta 85:15) para dar el compuesto 3 puro (1,176 g, 86%).

5 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,39 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,12 (s a, 1H), 7,40 (s a, 1H), 7,30 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 7,08 (s a, 1H), 6,91 (t, *J* = 12,0 Hz, 1H), 6,86 (t, *J* = 10,0 Hz, 1H), 6,22 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,18 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 5,67 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,63-5,61 (m, 2H), 5,28 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 4,94-4,91 (m, 1H), 4,81-4,76 (m, 1H), 4,42 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,23-4,19 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,87-2,82 (m, 1H), 2,58-2,46 (m, 3H), 2,42-2,35 (m, 3H), 2,08 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,16 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,06 (s, 9H).

10 <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168,5, 166,4, 161,5, 148,7, 145,2, 140,4, 137,6, 137,0, 134,4, 133,9, 133,0, 130,9, 124,2, 123,9, 121,0, 120,5, 117,03, 110,0, 108,1, 104,1, 81,7, 77,8, 60,4, 55,4, 37,2, 34,5, 26,6, 26,3, 21,0, 17,1, 16,6.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 656,30. Encontrado: 657,3 (M+H)<sup>+</sup>.

### (b) Preparación del compuesto 4

15 A una disolución del compuesto 3 (1,160 g, 1,78 mmol) en DCM (45 ml), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, se le añadió propano-1,3-diamina (0,19 ml, 2,22 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y luego se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiNH<sub>2</sub>, DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 100:0 hasta 97:3) para obtener el compuesto 4 puro (800 mg, 68%).

20 <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 7,34-7,26 (m, 1H), 6,99-6,74 (m, 2H), 6,50 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,15 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 5,83 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 5,68-5,57 (m, 2H), 5,27 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 4,80 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,52-4,44 (m, 2H), 4,24-4,17 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,39-3,17 (m, 2H), 2,93-2,82 (m, 1H), 2,78 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,50-2,34 (m, 2H), 2,34-2,24 (m, 2H), 2,19-1,99 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,84 (s, 3H), 1,72-1,50 (m, 2H), 1,16 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,04 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168,4, 166,1, 161,5, 156,7, 145,2, 139,9, 137,1, 134,0, 133,9, 131,8, 124,3, 124,2, 122,5, 120,9, 108,1, 105,5, 81,8, 74,3, 60,6, 55,4, 39,81, 39,30 37,2, 34,7, 33,1, 31,5, 29,6, 26,7, 26,2, 21,0, 17,1, 16,6.

25 ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 662,30. Encontrado: 663,3 (M+H)<sup>+</sup>.

### (c) Preparación del compuesto 1

30 A una disolución del compuesto 4 (52 mg, 0,078 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (b) anterior, y éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimidohexanoico (27,1 mg, 0,088 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió DIPEA (15 μl, 0,086 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 1 objetivo puro (29,7 mg, 44%).

35 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,86 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,30 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 6,90 (td, *J* = 11,5, 1,2 Hz, 1H), 6,78 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 6,68 (s a, 2H), 6,63 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,51 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 6,16 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,76 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 5,72 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,65 (dd, *J* = 6,4, 2,9 Hz, 1H), 5,62-5,57 (m, 1H), 5,29 (d, *J* = 11,1 Hz, 1H), 4,81 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,52-4,48 (m, 2H), 4,24 (ddd, *J* = 11,4, 7,3, 4,3 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,50 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,33-3,10 (m, 4H), 2,93-2,81 (m, 1H), 2,45-2,31 (m, 5H), 2,17 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,10-1,98 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,84 (s, 3H), 1,72-1,54 (m, 8H), 1,16 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

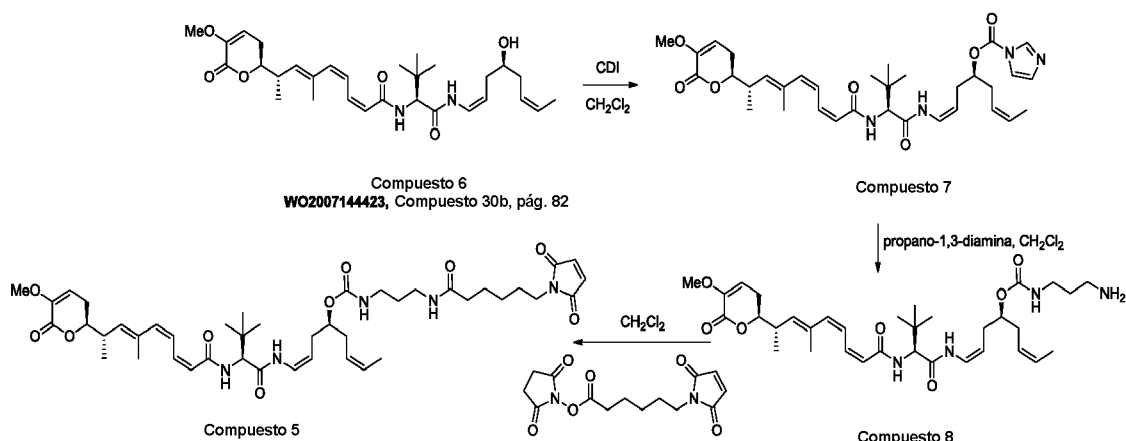
40 <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173,8, 170,8, 168,3, 166,5, 161,6, 157,1, 145,1, 140,4, 137,5, 134,2, 134,1, 134,0, 131,9, 124,2, 124,0, 122,5, 120,6, 108,3, 106,0, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 37,7, 37,6, 37,2, 36,3, 36,1, 34,7, 33,4, 31,0, 29,8, 28,3, 26,7, 26,3, 26,2, 25,6, 21,0, 17,2, 16,6.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>: 855,42. Encontrado: 856,5 (M+H)<sup>+</sup>.

## Ejemplo 2

### Preparación del compuesto 5





## (a) Preparación del compuesto 7

A una disolución del compuesto 6 (compuesto 30b, preparado tal como se describe en el documento WO 2007144423) (750 mg, 1,42 mmol) en DCM (35,5 ml) se le añadió 1,1'-carbonildiimidazol (691 mg, 4,26 mmol). Después de agitarse a 23°C durante la noche, se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 7 puro (717 mg, 81%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,24 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,36-7,23 (m, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,95-6,83 (m, 2H), 6,34 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 6,14 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,74-5,57 (m, 3H), 5,43-5,34 (m, 1H), 5,28 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 4,98-4,88 (m, 1H), 4,78 (q, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,47 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,25-4,16 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 2,92-2,76 (m, 1H), 2,59-2,37 (m, 6H), 1,83 (s, 3H), 1,64 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,14 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,03 (s, 9H).

## (b) Preparación del compuesto 8

A una disolución del compuesto 7 (1,68 g, 2,7 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en DCM (80 ml) se le añadió propano-1,3-diamina (0,27 ml, 3,24 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 100:0 hasta 97:3) para obtener el compuesto 8 (854 mg, 50%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 7,39-7,18 (m, 1H), 6,92-6,84 (m, 2H), 6,50 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,15 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 5,75-5,67 (m, 2H), 5,66-5,54 (m, 2H), 5,46-5,33 (m, 1H), 5,26 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 4,83 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,50-4,48 (m, 2H), 4,30-4,04 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,39-3,17 (m, 2H), 2,93-2,82 (m, 1H), 2,78 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,50-2,34 (m, 3H), 2,34-2,24 (m, 2H), 2,19-1,99 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,72-1,50 (m, 2H), 1,62 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,16 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,04 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168,3, 166,2, 161,6, 157,1, 145,1, 139,9, 137,1, 134,0, 133,9, 126,9, 124,9, 124,2, 123,9, 120,9, 108,2, 106,3, 81,8, 75,0, 60,6, 55,4, 39,6, 37,2, 34,7, 32,8, 31,5, 31,1, 29,6, 26,7, 26,2, 17,1, 16,6, 12,9.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 628,4. Encontrado: 629,5 (M+H)<sup>+</sup>.

## (c) Preparación del compuesto 5

A una disolución del compuesto 8 (150 mg, 0,24 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (b) anterior, en DCM (8 ml) a 23°C se le añadió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimidohexanoico (88,3 mg, 0,28 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 18 h y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 5 objetivo puro (75 mg, 38%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,87 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,32-7,22 (m, 1H), 6,89 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 6,78 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,61 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,54 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 6,15 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,77-5,51 (m, 2H), 5,64 (dd, *J* = 6,4, 3,0 Hz, 1H), 5,60-5,55 (m, 1H), 5,38 (ddd, *J* = 13,0, 8,8, 6,6 Hz, 1H), 5,28 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,83 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,59-4,44 (m, 2H), 4,23 (ddd, *J* = 11,5, 7,2, 4,4 Hz, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,49 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,29-3,12 (m, 4H), 2,87-2,81 (m, 1H), 2,48-2,32 (m, 5H), 2,18-2,09 (m, 3H), 1,88-1,82 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,67-1,55 (m, 7H), 1,62 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,15 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,04 (s, 9H).

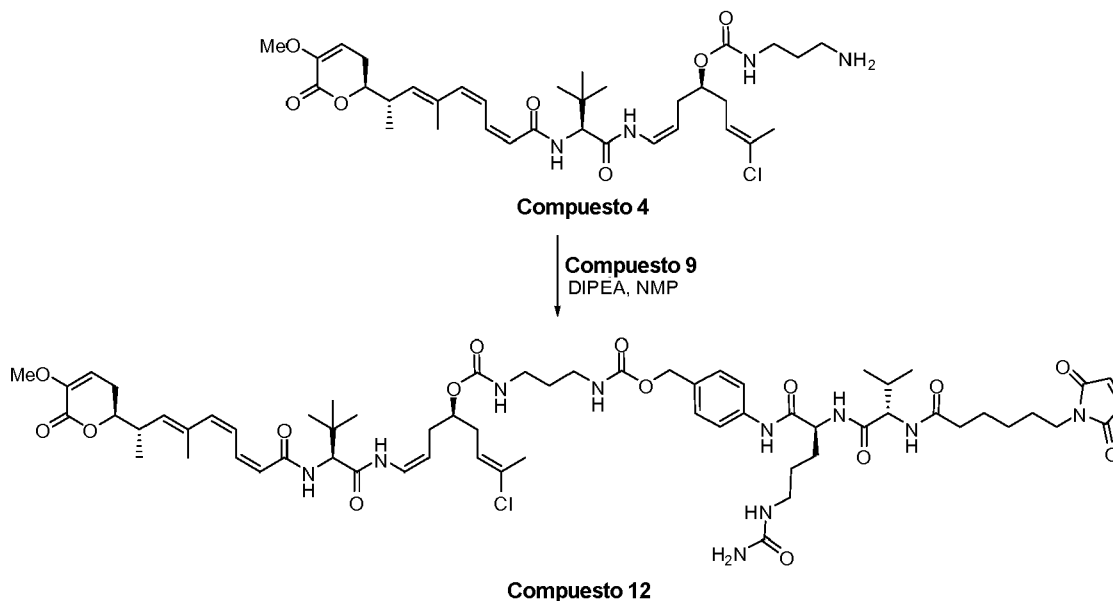
<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173,6, 170,8, 168,2, 166,4, 161,6, 157,4, 145,2, 140,2, 137,4, 134,2, 134,1, 134,0, 127,0, 124,9, 123,9, 120,7, 108,3, 106,5, 81,8, 75,3, 60,6, 55,4, 37,7, 37,6, 37,2, 36,3, 36,0, 34,7, 31,8, 31,6, 31,1, 29,9, 28,3, 26,7, 26,4, 26,2, 25,2, 22,6, 17,2, 16,6.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $C_{44}H_{63}N_5O_{10}$ : 821,5. Encontrado: 822,4 (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 3

Preparación del compuesto 12

(a) Preparación del compuesto 12



5

Se añadió DIPEA (25  $\mu$ l, 0,14 mmol) a una disolución del compuesto 9 (94,5 mg, 0,13 mmol), preparado tal como se mostró en el ejemplo preparativo anterior, y compuesto 4 (85 mg, 0,13 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 1(b) anterior, en NMP (6,5 ml) a 23°C. Después de 9 h, se diluyó la mezcla de reacción con H<sub>2</sub>O y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 100:0 hasta 90:10). Finalmente, se logró la purificación del compuesto 12 objetivo (35,7 mg, 22%) mediante HPLC semipreparativa (simetría C<sub>18</sub>, 7  $\mu$ m, 19 x 150 mm, gradiente H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>CN, flujo 15 ml/min, detección UV).

10

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7,49 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 2H), 7,22 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 2H), 7,19 (t,  $J$  = 11,8 Hz, 1H), 6,96 (dd,  $J$  = 23,5, 8,9 Hz, 1H), 6,84 (t,  $J$  = 11,5 Hz, 1H), 6,70-6,64 (m, 1H), 6,64 (s, 2H), 6,10 (d,  $J$  = 11,6 Hz, 1H), 5,93 (t,  $J$  = 6,2 Hz, 1H), 5,82 (t,  $J$  = 6,2 Hz, 1H), 5,69 (d,  $J$  = 11,4 Hz, 1H), 5,61 (dd,  $J$  = 6,3, 3,1 Hz, 1H), 5,54 (t,  $J$  = 7,8 Hz, 1H), 5,22 (d,  $J$  = 9,7 Hz, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,75 (q,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 4,55-4,49 (m, 2H), 4,43-4,36 (m, 1H), 4,23-4,10 (m, 2H), 3,59 (s, 3H), 3,44 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 2H), 3,18-3,04 (m, 8H), 2,82-2,72 (m, 1H), 2,49-2,34 (m, 3H), 2,27 (t,  $J$  = 7,1 Hz, 2H), 2,18 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 2H), 2,16-2,06 (m, 1H), 2,01-1,95 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,87-1,79 (m, 1H), 1,78 (s, 3H), 1,73-1,40 (m, 11H), 1,35-1,20 (m, 2H), 1,09 (d,  $J$  = 10,0 Hz, 3H), 0,96 (s, 9H), 0,87 (dd,  $J$  = 6,8, 4,3 Hz, 6H).

15

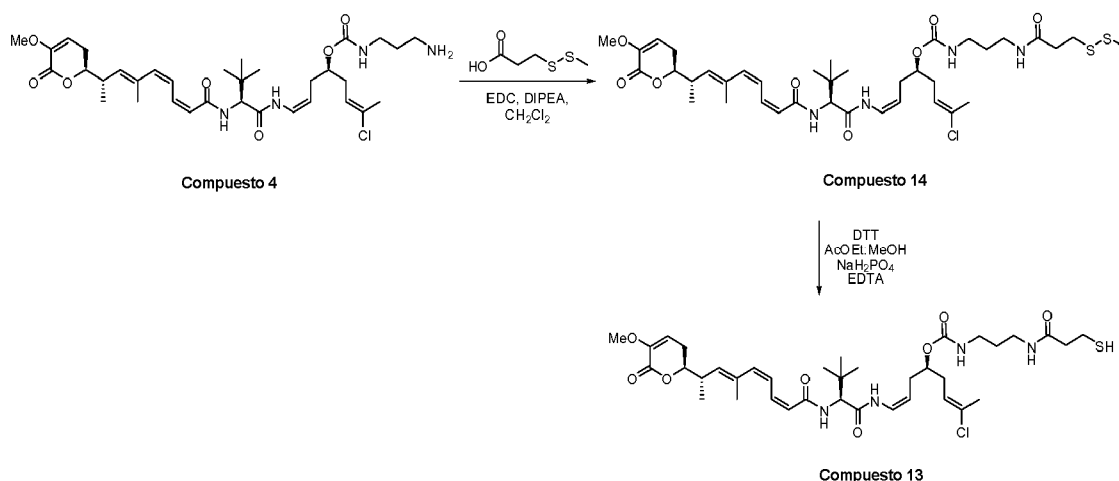
20

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174,1, 172,2, 171,0, 170,3, 168,8, 166,8, 162,1, 160,2, 157,0, 156,9, 144,9, 140,2, 137,7, 137,5, 134,0, 132,4, 131,7, 128,7, 124,0, 123,4, 122,4, 120,4, 119,8, 111,5, 108,6, 107,0, 81,9, 73,8, 68,6, 66,2, 60,3, 58,8, 55,4, 53,0, 37,6, 37,5, 37,1, 35,9, 34,6, 33,2, 30,6, 29,9, 29,2, 28,0, 26,5, 26,2, 26,0, 25,0, 22,6, 20,8, 19,1, 18,2, 17,04, 16,4.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $C_{63}H_{89}ClN_{10}O_{15}$ : 1260,6. Encontrado: 1261,6 (M+H)<sup>+</sup>.

### 25 Ejemplo 4

Preparación del compuesto 13



## (a) Preparación del compuesto 14

A una disolución del compuesto 4 (110 mg, 0,17 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 1(b) anterior, y ácido 3-(metildisulfanil)propanoico (34 mg, 0,22 mmol) en DCM (5 ml) se le añadieron clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (47,8 mg, 0,22 mmol) y *N,N'*-diisopropiletilamina (3,8  $\mu$ l, 0,22 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 6 h, se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 14 puro (123 mg, 93%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,88 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,29-7,24 (m, 1H), 6,90 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,63 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,16 (dd, *J* = 11,5, 1,5 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 5,68-5,51 (m, 3H), 5,29 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,81 (q, *J* = 8,2 Hz, 1H), 4,52 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 4,52-4,43 (m, 1H), 4,24 (ddd, *J* = 11,5, 7,3, 4,3 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,37-3,21 (m, 3H), 3,21-3,12 (m, 1H), 2,97 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,60 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,49-2,35 (m, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,33 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,14-2,07 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,84 (s, 3H), 1,73-1,64 (m, 2H), 1,16 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171,6, 168,2, 166,4, 161,6, 157,2, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 131,9, 124,4, 124,1, 122,4, 120,7, 108,3, 105,6, 81,8, 74,8, 60,6, 60,4, 55,5, 37,8, 37,2, 36,2, 35,6, 34,7, 33,1, 31,0, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 21,0, 17,2, 16,6.

## (b) Preparación del compuesto 13

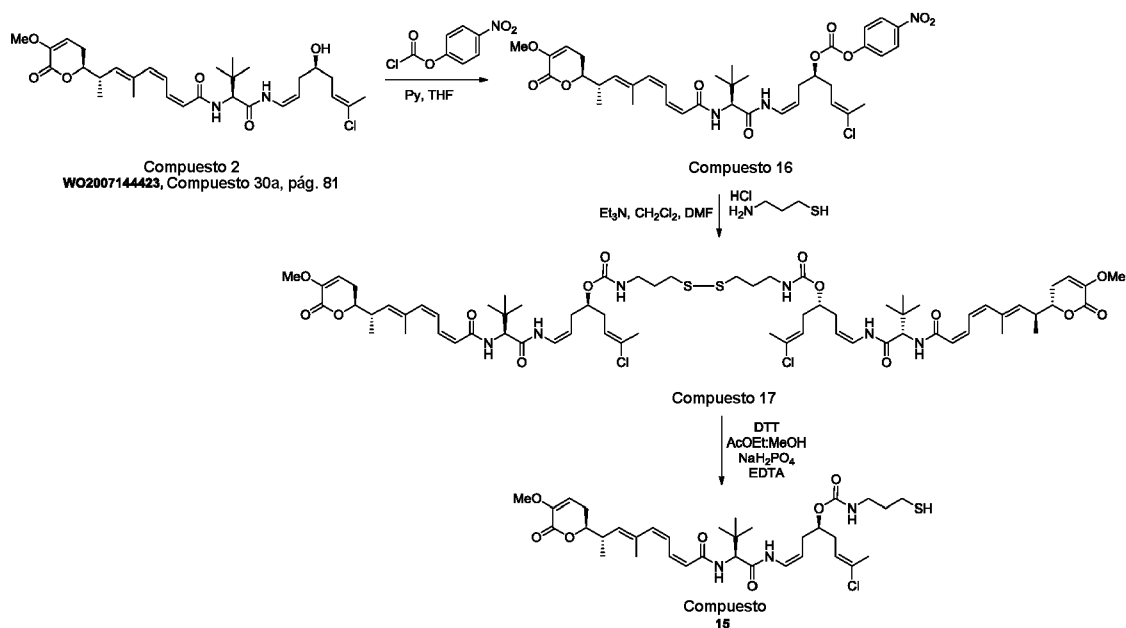
Se trató una disolución del compuesto 14 (100 mg, 0,125 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en una mezcla de EtOAc (4,3 ml) y CH<sub>3</sub>OH (4,3 ml) con una disolución de ditioneitol (154,8 mg, 1,0 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (4,3 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a 23°C durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M (13 ml) a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y luego se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el producto en bruto en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 13 objetivo puro (35 mg, 37%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,91 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,27-7,24 (m, 1H), 6,91 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 6,67 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,16 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,71 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,66-5,57 (m, 3H), 5,29 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 4,84 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,51 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 4,50-4,45 (m, 1H), 4,24-4,20 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,36-3,12 (m, 4H), 2,90-2,71 (m, 3H), 2,64-2,24 (m, 7H), 2,14-2,04 (m, 1H), 2,06 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,73-1,68 (m, 2H), 1,15 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>37</sub>H<sub>55</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S: 750,3. Encontrado: 773,2 (M+Na)<sup>+</sup>.

Ejemplo 5

Preparación del compuesto 15



## (a) Preparación del compuesto 16

A una disolución del compuesto 2 (compuesto 30a, preparado tal como se describe en el documento WO 2007144423) (300 mg, 0,53 mmol) en DCM (5 ml) se le añadieron piridina (85  $\mu$ l, 1,06 mmol) y clorocarbonato de 4-nitrofenilo (214,7 mg, 1,06 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 1,5 h, se diluyó con ácido cítrico al 10% y se extrajo con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 16 puro (307 mg, 80%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,29 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 8,08 (d,  $J$  = 10,9 Hz, 1H), 7,44 (d,  $J$  = 9,1 Hz, 2H), 7,27-7,22 (m, 1H), 6,92-6,83 (m, 2H), 6,20 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 1H), 6,17 (dd,  $J$  = 11,6, 1,4 Hz, 1H), 5,67-5,58 (m, 3H), 5,29 (d,  $J$  = 10,0 Hz, 1H), 4,84 (q,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,77-4,72 (m, 1H), 4,41 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H), 4,22 (ddd,  $J$  = 11,5, 7,5, 4,4 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 2,89-2,82 (m, 1H), 2,54-2,33 (m, 6H), 2,10 (d,  $J$  = 1,2 Hz, 3H), 1,85 (d,  $J$  = 1,3 Hz, 3H), 1,17 (d,  $J$  = 6,7 Hz, 3H), 1,02 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  168,4, 166,1, 161,5, 155,3, 152,5, 145,5, 145,2, 140,4, 137,6, 134,3, 134,0, 133,2, 125,3, 124,4, 124,1, 121,8, 121,2, 120,4, 108,1, 104,6, 81,8, 79,1, 60,4, 55,5, 37,3, 34,7, 32,7, 30,1, 26,6, 26,3, 21,1, 17,2, 16,6.

## (b) Preparación del compuesto 17

A una disolución del compuesto 16 (156,3 mg, 0,21 mmol) en DCM (2,5 ml) se le añadieron una suspensión de clorhidrato de 3-aminopropano-1-tiol (44,8 mg, 0,26 mmol) en DCM (2,5 ml), trietilamina (58  $\mu$ l, 0,34 mmol) y DMF (0,1 ml) a 23°C. Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 3 h, se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 17 puro (80 mg, 95%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,68 (d,  $J$  = 10,6 Hz, 1H), 7,28 (t,  $J$  = 11,6 Hz, 1H), 6,89 (t,  $J$  = 11,5 Hz, 1H), 6,76 (t,  $J$  = 9,6 Hz, 1H), 6,65 (d,  $J$  = 9,1 Hz, 1H), 6,13 (d,  $J$  = 11,7 Hz, 1H), 5,87-5,51 (m, 4H), 5,28 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 1H), 4,77 (q,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,61-4,39 (m, 2H), 4,29-4,00 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,31-3,18 (m, 2H), 2,98-2,77 (m, 1H), 2,68 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 2H), 2,55-2,22 (m, 6H), 2,04 (s, 3H), 2,00-1,80 (m, 2H), 1,83 (s, 3H), 1,15 (d,  $J$  = 6,6 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM  $m/z$ : calculado para C<sub>68</sub>H<sub>98</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>: 1356,6. Encontrado: 1357,3 (M+H)<sup>+</sup>.

## (c) Preparación del compuesto 15

Se trató una disolución del compuesto 17 (59,4 mg, 0,044 mmol) en una mezcla de EtOAc (1,5 ml) y CH<sub>3</sub>OH (1,5 ml) con una disolución ditiotreitól (0,35 ml, 0,35 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (1,5 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a 23°C durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y el extrajo con EtOAc (x3). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 15 objetivo puro (31 mg, 59%).

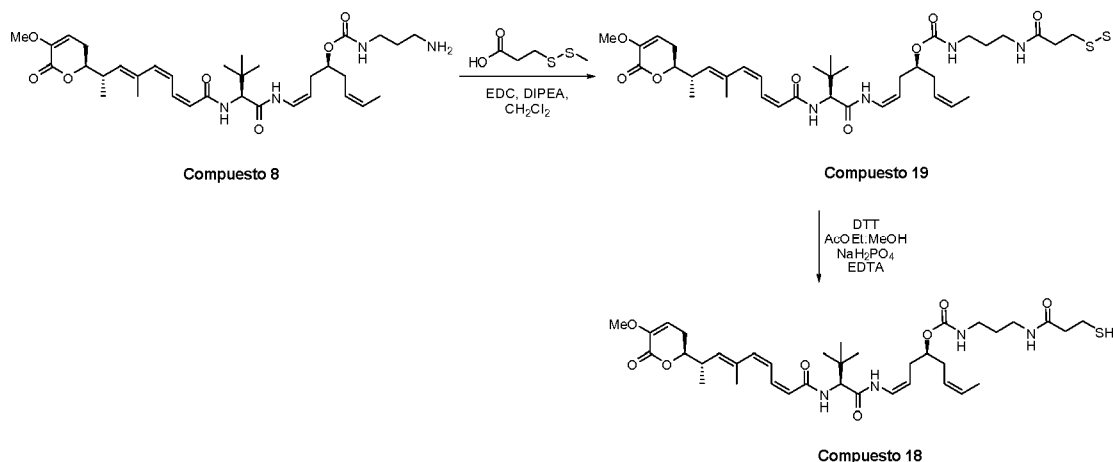
$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,66 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 7,29 (t,  $J = 11,2$  Hz, 1H), 6,91 (t,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,83 (t,  $J = 9,7$  Hz, 1H), 6,38 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 6,17 (d,  $J = 11,8$  Hz, 1H), 5,70 (d,  $J = 11,4$  Hz, 1H), 5,65-5,51 (m, 2H), 5,34 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 5,29 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1H), 4,82 (q,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,56-4,48 (m, 1H), 4,45 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 4,22 (ddd,  $J = 11,4, 7,5, 4,3$  Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,31 (q,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 2,88-2,83 (m, 1H), 2,55 (q,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 2,47-2,30 (m, 5H), 2,12-2,07 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,88-1,76 (m, 5H), 1,17 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,06 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168,2, 166,2, 161,5, 156,7, 145,2, 140,2, 137,3, 134,2, 134,0, 132,0, 124,4, 124,2, 122,3, 120,8, 108,1, 105,5, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 39,6, 37,3, 34,6, 33,9, 33,3, 30,8, 26,7, 26,3, 21,8, 21,1, 17,2, 16,7.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{ClN}_3\text{O}_7\text{S}$ : 679,3. Encontrado: 702,4 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

## 10 Ejemplo 6

### Preparación del compuesto 18



#### (a) Preparación del compuesto 19

A una disolución del compuesto 8 (280 mg, 0,45 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 2(b) anterior, y ácido 3-(metildisulfanyl)propanoico (88 mg, 0,58 mmol) en DCM (7,5 ml) se le añadieron clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (126 mg, 0,58 mmol) y *N,N'*-diisopropiletilamina (0,1 ml, 0,58 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 3 h, se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajo con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 19 puro (240 mg, 71%).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,91 (d,  $J = 10,8$  Hz, 1H), 7,34-7,20 (m, 1H), 6,89 (t,  $J = 11,4$  Hz, 1H), 6,83-6,72 (m, 2H), 6,51 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1H), 6,16 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H), 5,70 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 5,64 (dd,  $J = 6,1, 3,3$  Hz, 1H), 5,61-5,55 (m, 2H), 5,47-5,33 (m, 1H), 5,28 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 4,84 (q,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,51 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H), 4,52-4,47 (m, 1H), 4,27-4,19 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,37-3,21 (m, 3H), 3,21-3,12 (m, 1H), 2,96 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,60 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,43-2,35 (m, 5H), 2,39 (s, 3H), 2,16-2,04 (m, 1H), 1,84 (s, 3H), 1,70-1,61 (m, 5H), 1,16 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,5, 168,1, 166,3, 157,4, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 127,0, 124,9, 124,0, 120,8, 108,3, 106,3, 81,8, 75,5, 60,6, 55,4, 53,4, 37,8, 37,2, 36,2, 35,9, 34,7, 33,1, 31,8, 31,2, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 17,2, 16,6, 13,0.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$ : 763,4. Encontrado: 762,4 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### (b) Preparación del compuesto 18

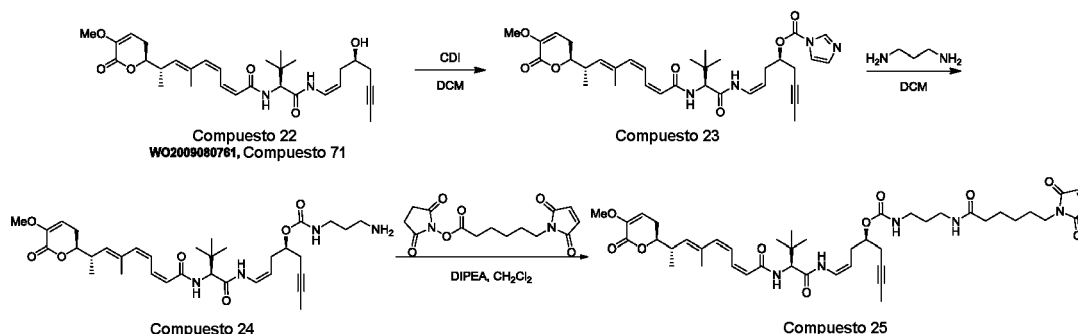
Se trató una disolución del compuesto 19 (240 mg, 0,31 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en una mezcla de EtOAc (15 ml) y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (22 ml) con una disolución ditiotreitól (0,79 ml de disolución 1,0 M, 0,79 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (17,4 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a 23°C durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M (21 ml) a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y el extrajo con acetato de etilo. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el producto en bruto en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 18 objetivo puro (105 mg, 47%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,93 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H), 7,30-7,22 (m, 1H), 6,90 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H) 6,86-6,72 (m, 2H), 6,48 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,16 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 5,65-5,55 (m, 3H), 5,48-5,34 (m, 1H), 5,29 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H), 4,84 (q, *J* = 9,4, 8,7 Hz, 1H), 4,52 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 4,57-4,44 (m, 1H), 4,32-4,17 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,39-3,20 (m, 3H), 3,22-3,09 (m, 1H), 2,90-2,75 (m, 3H), 2,50 (t, *J* = 6,9, 2H), 2,45-2,28 (m, 5H), 2,16-2,08 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,72-1,65 (m 2H), 1,64 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,16 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S: 716,4. Encontrado: 717,3 (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 7

#### Preparación del compuesto 25



#### 10 (a) Preparación del compuesto 23

A una disolución del compuesto 22 (333 mg, 0,63 mmol) (compuesto 71, preparado tal como se describe en el documento WO 2009080761) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12,5 ml) se le añadió 1,1'-carbonyldiimidazol (308 mg, 1,90 mmol). Después de agitarse a 23°C durante la noche, se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 23 puro (344 mg, 88%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,14 (s, 1H), 8,11 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,28 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 7,08 (dd, *J* = 1,7, 0,9 Hz, 1H), 6,96-6,81 (m, 2H), 6,26 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 6,17 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,66 (dt, *J* = 11,4, 1,4 Hz, 1H), 5,62 (dd, *J* = 5,9, 3,5 Hz, 1H), 5,28 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 5,04-4,89 (m, 1H), 4,80 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,40 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 4,21 (ddd, *J* = 10,3, 7,5, 5,3 Hz, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,91-2,78 (m, 1H), 2,68-2,49 (m, 3H), 2,45-2,31 (m, 2H), 1,89 (t, *J* = 2,5 Hz, 3H), 1,84 (s, 3H), 1,15 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 620,32. Encontrado: 621,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### (b) Preparación del compuesto 24

A una disolución del compuesto 23 (0,130 g, 0,21 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,5 ml) se le añadió propano-1,3-diamina (0,022 ml, 0,26 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 6 horas y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 100:0 hasta 97:3) para obtener el compuesto 24 (120 mg, 91%).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,71 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,28 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 6,91-6,77 (m, 2H), 6,44 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,14 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,77-5,57 (m, 3H), 5,27 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,83 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,57-4,53 (m, 1H), 4,46 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,31-4,11 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,31-3,24 (m, 2H), 2,93-2,67 (m, 3H), 2,56-2,24 (m, 6H), 2,16 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,63 (dd, *J* = 9,6, 3,5 Hz, 2H), 1,15 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,04 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168,3, 166,1, 161,6, 156,5, 145,2, 140,0, 137,2, 134,1, 134,0, 124,3, 124,2, 120,9, 108,1, 106,0, 81,8, 78,4, 74,5, 73,2, 60,6, 55,4, 39,8, 39,2, 37,3, 34,8, 33,0, 30,9, 30,2, 26,7, 26,3, 17,2, 16,7, 3,6.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 626,37. Encontrado: 627,3 (M+H)<sup>+</sup>.

#### (c) Preparación del compuesto 25

A una disolución del compuesto 24 (40 mg, 0,064 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (b) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) se le añadió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimidohexanoico (21,6 mg, 0,07 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 25 puro (33,5 mg, 64%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,67 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,29-7,23 (m, 1H), 6,90 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,80 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,46 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,42 (s a, 1H), 6,16 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 5,73-5,67 (m, 2H), 5,64

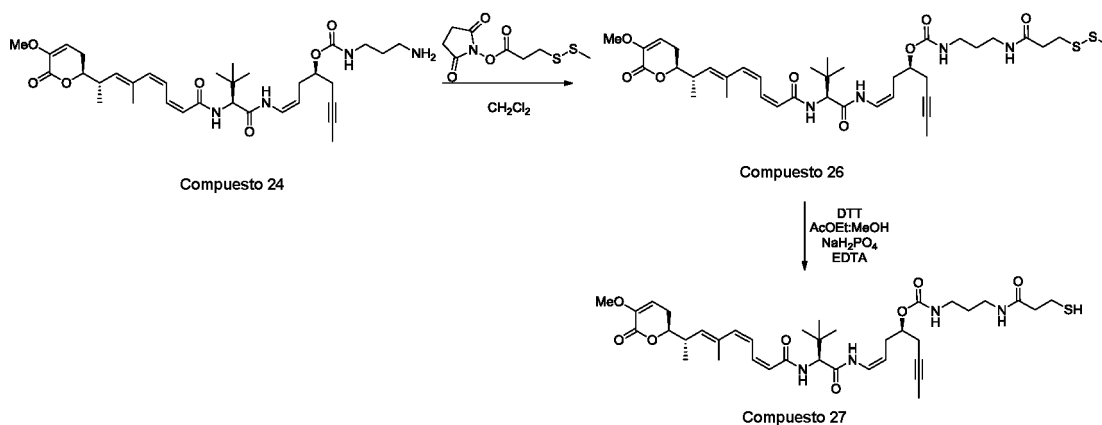
(dd,  $J = 6,2, 3,1$  Hz, 1H), 5,30 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H), 4,86 (q,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 4,63-4,54 (m, 1H), 4,44 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 4,30-4,18 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,50 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 3,34-3,10 (m, 3H), 2,85 (dt,  $J = 9,9, 6,9$  Hz, 1H), 2,54-2,37 (m, 4H), 2,36-2,28 (m, 1H), 2,16 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,84 (d,  $J = 1,3$  Hz, 3H), 1,83-1,81 (m, 3H), 1,70-1,51 (m, 8H), 1,34-1,23 (m, 2H), 1,16 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

- 5  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173,4, 170,8, 168,1, 166,4, 161,6, 157,0, 145,2, 140,3, 137,5, 134,3, 134,1, 133,9, 124,2, 120,7, 108,2, 106,2, 81,8, 78,4, 74,3, 73,5, 60,7, 55,4, 37,7, 37,6, 37,3, 36,4, 35,9, 34,6, 32,8, 30,3, 29,9, 28,3, 26,7, 26,4, 26,2, 25,4, 25,2, 24,4, 17,2, 16,6, 3,6.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{ClN}_5\text{O}_{10}$ : 819,44. Encontrado: 820,4 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

### Ejemplo 8

- 10 Preparación del compuesto 27



#### (a) Preparación del compuesto 26

- 15 A una disolución del compuesto 24 (70 mg, 0,11 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 7(b) anterior, en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) se le añadió éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 3-(metildisulfanil)propanoico (36,2 mg, 0,12 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a  $23^\circ\text{C}$  durante 16 h y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 26 puro (46,3 mg, 61%) como un sólido blanco.

- 20  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,72 (d,  $J = 10,8$  Hz, 1H), 7,29-7,19 (m, 1H), 6,90 (t,  $J = 11,3$  Hz, 1H), 6,80 (t,  $J = 9,7$  Hz, 1H), 6,69 (t,  $J = 6,1$  Hz, 1H), 6,47 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 6,16 (d,  $J = 11,0$  Hz, 1H), 5,69 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 5,64 (dd,  $J = 6,3, 3,1$  Hz, 1H), 5,30 (d,  $J = 0,5$  Hz, 1H), 4,86 (q,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 4,60-4,54 (m, 1H), 4,46 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 4,23 (ddd,  $J = 11,5, 7,4, 4,8$  Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,33-3,22 (m, 3H), 3,19-3,14 (m, 1H), 2,96 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,66-2,54 (m, 1H), 2,59 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,48-2,42 (m, 5H), 2,40 (s, 3H), 2,38-2,28 (m, 1H), 1,83 (s, 3H), 1,82 (s, 3H), 1,73-1,64 (m, 2H), 1,16 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

- 25  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171,5, 168,1, 166,4, 165,2, 157,0, 145,1, 140,4, 137,5, 134,3, 134,0, 124,20, 124,0, 120,7, 108,2, 106,2, 81,8, 78,4, 74,2, 73,6, 60,7, 55,4, 37,8, 37,3, 35,9, 34,6, 33,1, 30,3, 29,8, 26,7, 26,2, 24,4, 23,0, 17,2, 16,6, 3,6.

#### (b) Preparación del compuesto 27

- 30 Se trató una disolución del compuesto 26 (44,3 mg, 0,064 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en una mezcla de EtOAc (3,6 ml) y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (3,6 ml) con una disolución de ditioneitol (0,19 ml de disolución 1,0 M, 0,19 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (3,6 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a  $23^\circ\text{C}$  durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M (21 ml) a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y luego se extrajo con acetato de etilo. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el producto en bruto en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 27 objetivo puro (33,6 mg, 74%) como un sólido blanco.

- 40  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,73 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 7,27 (t,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,91 (td,  $J = 11,5, 1,1$  Hz, 1H), 6,94-6,86 (m, 1H), 6,85-6,77 (m, 1H), 6,43 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 6,17 (dd,  $J = 12,0, 1,6$  Hz, 1H), 5,71 (d,  $J = 11,4$  Hz, 1H), 5,65 (dd,  $J = 6,5, 2,9$  Hz, 1H), 5,54 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 5,30 (d,  $J = 10,5$  Hz, 1H), 4,84 (q,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,53 (d,  $J = 9,5$  Hz, 1H), 4,48-4,44 (m, 1H), 4,24 (ddd,  $J = 11,5, 7,3, 4,2$  Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,336-3,22 (m, 3H), 3,21-3,10 (m, 1H), 2,89-2,84 (m, 1H), 2,80 (dt,  $J = 8,2, 6,8$  Hz, 2H), 2,49 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,45-2,36 (m, 5H), 2,31-2,28 (m, 1H), 1,84 (s, 3H), 1,83 (s, 3H), 1,72-1,69 (m, 2H), 1,16 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S: 714,37. Encontrado: 737,3 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 9

Preparación de conjugado anticuerpo-fármaco ADC1 con trastuzumab y compuesto 1

(a) Reducción parcial de trastuzumab para dar trastuzumab parcialmente reducido (compuesto 20)

- 5 Se diluyó una disolución de trastuzumab (trastuzumab adquirido de Roche como un polvo liofilizado blanco para la preparación de una disolución concentrada para infusión) (9,52 ml, 200 mg, 1,38 μmol) hasta una concentración de 5 mg/ml con tampón acetato/histidina 20 mM (pH 5,5, 30,5 ml) seguido por un ajuste del pH con tampón fosfato/EDTA (pH 8,4, 13 ml). Se realizó reducción parcial de los enlaces disulfuro en el anticuerpo mediante la adición de una disolución de clorhidrato de tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP) 5,17 mM (689 μl, 3,562 μmol, 2,6 eq.) Se dejó agitar la reacción de reducción durante 90 min a 20°C. Inmediatamente después de la reducción, se realizó un ensayo de Ellman para dar una razón tiol libre con respecto a anticuerpo (FTAR) de 4,1, muy próxima al valor de 4,0, tal como se planeó.

(b) Preparación de ADC1

- 15 A la disolución de trastuzumab parcialmente reducido, compuesto 20 (24,98 ml, 93,0 mg, 0,64 μmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 7(a) anterior, se le añadió en DMSO (1,25 ml) seguido por la adición de una disolución recién preparada del compuesto 1, preparado tal como se describió en el ejemplo 1, (10 mM en DMSO, 366 μl, 3,66 μmol, 5,7 eq.). Tras la adición del compuesto 1, la disolución se volvió muy turbia, por tanto, se añadió adicionalmente DMSO (1 ml). Se agitó la reacción de conjugación durante 30 min a 20°C y la turbidez desapareció durante la reacción de conjugación. Se extinguió el exceso de fármaco mediante la adición de *N*-acetilcisteína (NAC) (10 mM, 366 μl, 3,66 μmol) seguido por agitación de la disolución durante 20 min. Se purificó la reacción de conjugación extinguida mediante centrifugación con Vivaspin y se intercambiò el tampón con el tampón de formulación PBS final. El producto objetivo final ADC1 se concentró hasta una concentración final de 8,56 mg/ml tal como se determina mediante UV y se obtuvo 7,4 ml (63,3 mg, 0,43 μmol, 68,0%) de disolución de ADC. Se realizaron series de SEC HPLC para determinar la pureza del producto (61,4%).

- 25 Se purificó adicionalmente ADC1 mediante cromatografía de filtración en gel preparativa en un sistema purificador Äkta usando una columna HiLoad 16/600 superdex 200 debido a la presencia de altas cantidades de agregados. Después de la agrupación, se determinó la concentración final (1,6 mg/ml) mediante UV y se determinó la pureza (90,9%) de los productos farmacológicos finales mediante SEC HPLC para dar 8,65 ml (13,7 mg, 0,09 μmol, 14,7%) de la disolución de ADC (ADC1).

#### Ejemplo 10

Preparación de conjugado anticuerpo-fármaco ADC2 con trastuzumab y compuesto 5

(a) Reducción parcial de trastuzumab para dar trastuzumab parcialmente reducido (compuesto 20)

- 35 Se diluyó una disolución de trastuzumab (14,29 ml, 300 mg, 2,06 μmol) hasta una concentración de 5 mg/ml con tampón acetato/histidina 20 mM (pH, 5,5, 45,74 ml) seguido por un ajuste del pH con tampón fosfato/EDTA (pH 8,4, 14,4 ml). Se realizó reducción parcial de los enlaces disulfuro en el anticuerpo mediante la adición de una disolución de clorhidrato de tris[2-carboxietil]fosfina 5 mM (1,07 ml, 5,36 μmol, 2,6 eq.). Se dejó agitar la reacción de reducción durante 90 min a 20°C. Inmediatamente después de la reducción, se realizó un ensayo de Ellman para dar una razón de tiol libre con respecto a anticuerpo (FTAR) de 4,1, muy próxima al valor de 4,0, tal como se planeó.

(b) Preparación de ADC2

- 40 A la disolución de trastuzumab parcialmente reducido, compuesto 20 (23,6 ml, 93,8 mg, 0,645 μmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 8(a) anterior, se le añadió DMSO (1,18 ml) seguido por la adición de disolución recién preparada del compuesto 5, preparado tal como se describió en el ejemplo 2, (10 mM en DMSO, 368 μl, 3,68 μmol, 5,7 eq.). Se añadió cuidadosamente el grupo de unión de fármaco en 10 porciones. Después de la sexta porción, la disolución se volvió ligeramente turbia y la turbidez no desapareció durante la reacción de conjugación y extinción. Se agitó la reacción de conjugación durante 30 min a 20°C. Se extinguió el exceso de fármaco mediante la adición de *N*-acetilcisteína (NAC) (10 mM, 368 μl, 3,68 μmol) agitando la disolución durante 46 min. Se filtró la disolución sobre un filtro de jeringa de 0,2 μm. Se concentró la reacción de conjugación extinguida hasta 16,5 mg/ml mediante centrifugación con Vivaspin y se purificó sobre columnas NAP-25. Se realizaron series de SEC HPLC para determinar la pureza del producto (36,1%).

- 50 Se purificó adicionalmente ADC2 mediante cromatografía de filtración en gel preparativa en un sistema purificador Äkta usando una columna HiLoad 16/600 superdex 200 debido a la presencia de altas cantidades de agregados. Después de la agrupación, se determinó la concentración final (3,7 mg/ml) mediante UV y se determinó la pureza (78,3%) del ADC objetivo final mediante SEC HPLC para dar 5,3 ml (19,4 mg, 19,4%) de la disolución de ADC (ADC2).



Ejemplo 11

Preparación de conjugado anticuerpo-fármaco ADC3 con trastuzumab y compuesto 12

## (a) Preparación de ADC3

5 A la disolución de trastuzumab parcialmente reducido, compuesto 20 (23,6 ml, 93,8 mg, 0,645  $\mu$ mol), preparado tal como se describió en el ejemplo 10(a) anterior, se le añadió DMSO (1,18 ml), seguido por la adición de disolución recién preparada del compuesto 12, preparado tal como se describió en el ejemplo 3, (10 mM en DMSO, 369  $\mu$ l, 3,69  $\mu$ mol, 5,7 eq.). Se añadió cuidadosamente el grupo de unión de fármaco en 10 porciones, no obstante, la disolución comenzó a enturbiarse después de la tercera porción. Se observó alta turbidez durante la adición de las dos últimas porciones. La disolución no se aclaró hasta la etapa de filtración. Se agitó la reacción de conjugación durante 31 min a 20°C. Se extinguió el exceso de fármaco mediante la adición de *N*-acetilcisteína (NAC) (10 mM, 369  $\mu$ l, 3,69  $\mu$ mol) agitando la mezcla de reacción durante 50 min. Se filtró la disolución de reacción de conjugación extinguida sobre un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m y se concentró hasta 14,2 mg/ml mediante centrifugación con Vivaspin. Luego se purificó sobre columnas NAP-25. Se realizaron series de SEC HPLC para determinar la pureza del producto (34,2%).

15 Se purificó adicionalmente ADC3 mediante cromatografía de filtración en gel preparativa en un sistema purificador Äkta usando una columna HiLoad 16/600 superdex 200 debido a la presencia de altas cantidades de agregados. Después de la agrupación, se determinó la concentración final (2,3 mg/ml) mediante UV y se determinó la pureza (78,6%) de los productos farmacológicos finales mediante SEC HPLC para dar 7,3 ml (16,6 mg, 16,6%) de la disolución de ADC (ADC3).

20 Ejemplo 12

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 4, 5 y 6 con trastuzumab y los compuestos 13, 15 y 18, respectivamente

## (a) Conjugación de SMCC con trastuzumab (compuesto 21)

25 Se intercambió el tampón de la disolución de trastuzumab (262 mg, 1,8  $\mu$ mol) por tampón fosfato (fosfato 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5) usando columnas NAP-25. A la disolución agrupada de trastuzumab en reactores de vidrio (16-17 g/l) se le añadió DMSO (5%). Se inició la conjugación del grupo de unión añadiendo SMCC (20,0 mM, 8,0 eq.) a la disolución de trastuzumab. Se agitó la reacción a 18°C durante 3 horas. Luego se purificó la mezcla de reacción sobre columnas NAP-25 para dar el compuesto 21. Se realizó un ensayo de Ellman inverso para determinar una LAR de 3,7.

## 30 (b) Conjugación de compuestos 13, 15 y 18 con trastuzumab-MCC: Preparación de ADC4, ADC5 y ADC6.

35 Para la reacción de conjugación, en una primera etapa, la disolución de conjugado de anticuerpo, compuesto 21, se diluyó con tampón fosfato (fosfato 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5) hasta una concentración de 10 g/l. Entonces, se añadió DMSO (5%) a la disolución del compuesto 21. Las reacciones de conjugación con los compuestos 13, 15 y 18 se llevaron a cabo añadiendo lentamente el fármaco (10 mM, 6,3-6,6 eq.) a la disolución del compuesto 21 y agitando durante cuatro horas a 18°C. Después de que la reacción de conjugación se completara, las mezclas de reacción se filtraron a 0,2  $\mu$ m y de nuevo se purificaron sobre columnas NAP-25 con un intercambio de tampón en tampón PBS 1 x. Se realizaron series de SEC HPLC para determinar la pureza del producto y se midió la concentración del producto final mediante UV.

40 Se aisló ADC a partir de la preparación de muestra con el compuesto 15 con buena pureza (74,5%) y se obtuvo un rendimiento del 56% (49 mg) y no requería purificación adicional. La concentración final (5,7 mg/ml) de la disolución de ADC5 (87 ml) se determinó mediante UV.

45 Sin embargo, en las dos preparaciones de muestra con el compuesto 13 y 18, estaban presentes especies moleculares bajas. Estas especies tenían un tiempo de retención muy similar al pico de producto y no se separaron bien en la columna de SEC. Con el fin de retirar posibles restos de fármacos todavía presentes en la disolución, las disoluciones se pasaron de nuevo sobre columnas NAP-25. Los cromatogramas después de la primera y segunda purificación de NAP-25 fueron idénticos, por tanto, las especies no surgían de fármacos libres todavía presentes en la disolución y debían ser de origen mayor. A continuación, las muestras se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel en una columna de exclusión molecular.

50 Después de la agrupación, se determinaron las concentraciones finales (2,8 y 3,9 mg/ml) mediante UV y se determinó la pureza (62,3% y 50,9%) de los productos farmacológicos finales mediante SEC HPLC para dar 6,7 ml (19,3 mg, 22,0%) de la disolución de ADC4 y 6,8 ml (26,7 mg, 30,5%) de la disolución de ADC6, respectivamente.

Ejemplo 13

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 7 y 8 con trastuzumab y los compuestos 25 y 27

## (a) Procedimientos generales

Se comprobó la concentración de anticuerpo de manera espectrofotométrica monitorizando su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $2,18E5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y un peso molecular de 150 kDa. Los tampones usados en estos procedimientos fueron o bien el tampón A (fosfato de sodio 50 mM pH 6,5 con EDTA 2 mM) o bien el tampón B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0) o bien el tampón fosfato salino ("PBS"). Se dedujo la razón fármaco con respecto a anticuerpo ("DAR") a partir de la razón grupo de unión con respecto a anticuerpo ("LAR") en el caso de conjugación por medio de Lys, o a partir de la razón Cys libre por mol de anticuerpo en el caso de conjugación dirigida a Cys, suponiendo que la reacción de conjugación del grupo de unión de fármaco a o bien el conector de maleimida o bien a Cys libre fue cuantitativa. Ambas determinaciones se basaron en la reacción colorimétrica de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") con grupos tiol libres para formar un aducto de tionitrobenzoato coloreado. Para la determinación de LAR, se realizó el aducto mezclando volúmenes iguales de una disolución 200  $\mu\text{M}$  de DTNB en tampón B con una disolución 200  $\mu\text{M}$  de *N*-acetil-cisteína en el mismo tampón. Entonces se mezclaron 75  $\mu\text{l}$  de esta mezcla con 75  $\mu\text{l}$  de la muestra de prueba y después de una incubación de 1 h se determinó de manera espectrofotométrica la absorbancia a 412 nm y se comparó el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico ("SMCC") para obtener la concentración de maleimidadas en la muestra. Esta concentración se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la LAR. Asimismo, se determinaron Cys libre mezclando 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de prueba con 150  $\mu\text{l}$  de DTNB 133  $\mu\text{M}$  en tampón B, monitorizando la absorbancia a 412 nm y comparando el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de Cys: la concentración deducida de Cys libre en la muestra de prueba se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la razón.

## (b) Preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco

Cuando la carga citotóxica se conjugó con residuos de Cys (como con el compuesto 25 para la preparación de ADC7), el anticuerpo se redujo previamente con clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina ("TCEP"). En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón B con la cantidad apropiada de una disolución 5 mM de TCEP en agua para mantener el agente reductor en un exceso de 2,5 veces con respecto al anticuerpo. Se incubó la mezcla y se agitó durante 60 min a 20°C y después de eso se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo reducido resultante para calcular la razón Cys libre con respecto a anticuerpo, mientras que la muestra restante se mezcló con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del compuesto 25 en DMSO para alcanzar un exceso de 6 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el anticuerpo reducido presenta habitualmente menos de 6 Cys libres por molécula de proteína, la razón molar del compuesto con respecto a la Cys libre accesible nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v) y se incubó la mezcla durante 30 min a 20°C. Después de eso se añadió *N*-acetil-cisteína para extinguir la reacción, usando el volumen apropiado de una disolución 10 mM en agua para hacer coincidir la concentración del grupo de unión de fármaco. El conjugado resultante se purificó finalmente del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 que ejecuta el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 2 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspin de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

Cuando la carga útil citotóxica se conjugó con residuos de Lys (como con el compuesto 27 para la preparación de ADC8), el anticuerpo se activó previamente con SMCC. En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón A con la cantidad apropiada de una disolución 20 mM de SMCC en DMSO para mantener el reactivo activador en un exceso de 8 veces con respecto al anticuerpo. Se añadió DMSO si era necesario para alcanzar una concentración de DMSO final del 5% (v/v). Se incubó la mezcla y se agitó durante 3 h a 18°C y entonces se retiró el exceso de SMCC mediante cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. Se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo activado resultante para calcular la LAR y se mezcló la muestra restante con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del compuesto 27 en DMSO para alcanzar un exceso de 8 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el valor de LAR nunca supera 8, esto garantiza que la razón molar del compuesto con respecto a los sitios de reacción accesibles nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v). Se incubó la mezcla durante 4 h a 18°C y se purificó el conjugado resultante del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su

absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 2 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspin de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

#### Ejemplo 14

##### 5 Preparación de anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD5 y anti-CD13

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD5 y anti-CD13 siguiendo procedimientos bien conocidos comúnmente usados en la técnica. En resumen, se inmunizaron ratones BALB/c con células HPB-ALL (para la producción definitiva de anticuerpo anti-CD4) o con células T humanas activadas con una mezcla de forbol 12-miristato 13-acetato y anticuerpo monoclonal anti-CD3 comercialmente disponible tal como describieron Cebrian *et al.* (1988, J. Exp. Med. 168:1621-1637) (para la producción definitiva de anticuerpo anti-CD5) o con células endoteliales humanas aisladas de cordón umbilical (para la producción definitiva de anticuerpo anti-CD13). Para ese fin, se inyectaron  $1,5 \times 10^7$  de las células correspondientes a los ratones por vía intraperitoneal en los días -45 y -30 y por vía intravenosa en el día -3. En el día 0, se extirparon el bazo de estos animales y se fusionaron células del bazo con células de mieloma de ratón SP2 a una razón de 4:1 según técnicas convencionales para producir los correspondientes hibridomas y se distribuyeron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar Corp., Cambridge, MA). Después de 2 semanas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de hibridoma y se sometió a prueba su reactividad contra la línea celular usada en la etapa de inmunización mediante citometría de flujo. Se sometieron a ensayo los sobrenadantes positivos tiñendo mediante inmunofluorescencia las células correspondientes usadas como antígenos. Los hibridomas que mostraban una tinción específica, un patrón de inmunoprecipitación y una distribución celular se seleccionaron y se clonaron y se subclonaron mediante dilución limitante.

Una vez que los clones se seleccionaron, se cultivaron las células en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml a 37°C durante 3-4 días hasta que el medio se volvió de color amarillo pálido. En ese punto, se retiraron dos tercios del volumen del medio, se centrifugaron a 1,000xg durante 10 min para sedimentar las células y el sobrenadante o bien se centrifugó de nuevo para limpieza adicional a 3.000xg durante 10 min o bien se filtró a través de membranas de tamaño de poro de 22  $\mu$ m. El sobrenadante clarificado se sometió a precipitación con sulfato de aluminio al 55% de saturación y volvió a suspenderse el sedimento resultante en Tris-HCl 100 mM pH 7,8 (1 ml por 100 ml del sobrenadante clarificado original) y se dializó a 4°C durante 16-24 h contra 5 l de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 con NaCl 150 mM, cambiando la disolución de dialización al menos tres veces. El material dializado se cargó finalmente sobre una columna de proteína A-Sepharose y se eluyó el anticuerpo monoclonal correspondiente con citrato de sodio 100 mM pH 3,0 o alternativamente con glicina 1 M pH 3,0. Aquellas fracciones que contenían el anticuerpo se neutralizaron con Tris-HCl 2 M pH 9,0 y finalmente se dializaron contra PBS y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### Ejemplo 15

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 9, 10 y 11 con anti-CD13 y los compuestos 1, 12 y 13

##### 35 (a) Procedimientos generales

En todos los métodos comunicados en el presente documento, se comprobó de manera espectrofotométrica la concentración de anticuerpo monitorizando su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $2,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y un peso molecular de 150 kDa. Los tampones usados en estos procedimientos fueron o bien el tampón A (fosfato de sodio 50 mM pH 6,5 con EDTA 2 mM) o el tampón B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0) o bien el tampón fosfato salino ("PBS"). Se dedujo la razón fármaco con respecto a anticuerpo ("DAR") a partir de la razón grupo de unión con respecto a anticuerpo ("LAR") en el caso de conjugación por medio de Lys, o a partir de la razón Cys libre por mol de anticuerpo en el caso de conjugación dirigida a Cys, suponiendo que la reacción de conjugación del grupo de unión de fármaco con o bien el conector de maleimida o bien con Cys libre fue cuantitativa. Ambas determinaciones se basaron en la reacción colorimétrica de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") con grupos tiol libres para formar un aducto de tionitrobenzoato coloreado. Para la determinación de LAR, se realizó el aducto mezclando volúmenes iguales de una disolución 200  $\mu$ M de DTNB en tampón B con una disolución 200  $\mu$ M de N-acetil-cisteína en el mismo tampón. Entonces se mezclaron 75  $\mu$ l de esta mezcla con 75  $\mu$ l de la muestra de prueba y después de una incubación de 1 h se determinó de manera espectrofotométrica la absorbancia a 412 nm y se comparó el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico ("SMCC") para obtener la concentración de maleimidadas en la muestra. Esta concentración se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la LAR. Asimismo, se determinaron Cys libre mezclando 50  $\mu$ l de la muestra de prueba con 150  $\mu$ l de DTNB 133  $\mu$ M en tampón B, monitorizando la absorbancia a 412 nm y comparando el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de Cys: la concentración deducida de Cys libre en la muestra de prueba se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la razón.

##### (b) Preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco

5 Cuando la carga útil citotóxica se conjugó con residuos de Cys (como con el compuesto 1 para la preparación de ADC9 o compuesto 12 para la preparación de ADC10), el anticuerpo se redujo previamente con clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina ("TCEP"). En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón B con la cantidad apropiada de una disolución 5 mM de TCEP en agua para mantener el agente reductor en un exceso de 2,5 veces con respecto al anticuerpo. Se incubó la mezcla y se agitó durante 60 min a 20°C y después de eso se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo reducido resultante para calcular la razón Cys libre con respecto a anticuerpo, mientras que la muestra restante se mezcló con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del grupo de unión de fármaco (compuesto 1 para ADC9 o compuesto 12 para ADC10) en DMSO para alcanzar un exceso de 6 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el anticuerpo reducido presenta habitualmente menos de 6 Cys libres por molécula de proteína, la razón molar del compuesto con respecto a la Cys libre accesible nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v) y se incubó la mezcla durante 30 min a 20°C. Después de eso se añadió N-acetil-cisteína para extinguir la reacción, usando el volumen apropiado de una disolución 10 mM en agua para hacer coincidir la concentración del grupo de unión de fármaco. El conjugado resultante se purificó finalmente del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 2 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspín de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

25 Cuando la carga útil citotóxica se conjugó con residuos de Lys (como con el compuesto 13 para la preparación de ADC11), el anticuerpo se activó previamente con SMCC. En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón A con la cantidad apropiada de una disolución 20 mM de SMCC en DMSO para mantener el reactivo activador en un exceso de 8 veces con respecto al anticuerpo. Se añadió DMSO si era necesario para alcanzar una concentración de DMSO final del 5% (v/v). Se incubó la mezcla y se agitó durante 3h a 18°C y entonces se retiró el exceso de SMCC mediante cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. Se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo activado resultante para calcular la LAR y se mezcló la muestra restante con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del compuesto 13 en DMSO para alcanzar un exceso de 8 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el valor de LAR nunca supera 8, esto garantiza que la razón molar del compuesto con respecto a los sitios de reacción accesibles nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v). Se incubó la mezcla durante 4h a 18°C y se purificó el conjugado resultante del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 2 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspín de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

#### 45 Ejemplo 16

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 12 y 13 con rituximab y los compuestos 1 y 12

##### (a) Procedimientos generales

50 Se comprobó de manera espectrofotométrica la concentración de anticuerpo monitorizando su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $2,45 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y un peso molecular de 150 kDa. Los tampones usados en estos procedimientos fueron o bien el tampón B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0) o bien el tampón fosfato salino ("PBS"). Se dedujo la razón fármaco con respecto a anticuerpo ("DAR") a partir de la razón Cys libre por mol de anticuerpo, suponiendo que la reacción de conjugación del grupo de unión de fármaco con Cys libre fue cuantitativa. La determinación se basó en la reacción colorimétrica de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") con grupos tiol libres para formar un aducto de tionitrobenzoato coloreado. Se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de prueba con 150  $\mu\text{l}$  de DTNB 133  $\mu\text{M}$  en tampón B, luego se midió la absorbancia a 412 nm y se comparó el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de Cys. La concentración deducida de Cys libre en la muestra de prueba se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la razón.

##### (b) Preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco

60 Antes de la conjugación con los grupos de unión de fármaco por medio de Cys, se redujo el anticuerpo con

clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina ("TCEP"). En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón B con la cantidad apropiada de una disolución 5 mM de TCEP en agua para mantener el agente reductor en un exceso de 2,5 veces con respecto al anticuerpo. Se incubó la mezcla y se agitó durante 60 min a 20°C y después de eso se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo reducido resultante para calcular la razón Cys libre con respecto a anticuerpo, mientras que la muestra restante se mezcló con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del grupo de unión de fármaco (compuesto 1 para ADC12 o compuesto 12 para ADC13) en DMSO para alcanzar un exceso de 6 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el anticuerpo reducido presenta habitualmente menos de 6 Cys libres por molécula de proteína, la razón molar del compuesto con respecto a la Cys libre accesible nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v) y se incubó la mezcla durante 30 min a 20°C. Después de eso, se añadió *N*-acetil-cisteína para extinguir la reacción, usando el volumen apropiado de una disolución 10 mM en agua para hacer coincidir la concentración del grupo de unión de fármaco. El conjugado resultante se purificó finalmente del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 1 mg/ml se concentró usando dispositivos Vivaspín de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

#### Ejemplo 17

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 14 y 15 con anti-CD5 y los compuestos 1 y 12

##### (a) Procedimientos generales

Se comprobó de manera espectrofotométrica la concentración de anticuerpo monitorizando su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $2,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y un peso molecular de 150 kDa. Los tampones usados en estos procedimientos fueron o bien el tampón B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0) o bien el tampón fosfato salino ("PBS"). Se dedujo la razón fármaco con respecto a anticuerpo ("DAR") a partir de la razón Cys libre por mol de anticuerpo, suponiendo que la reacción de conjugación del grupo de unión de fármaco con Cys libre fue cuantitativa. La determinación se basó en la reacción colorimétrica de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") con grupos tiol libres para formar un aducto de tionitrobenzoato coloreado. Se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de prueba con 150  $\mu\text{l}$  de DTNB 133  $\mu\text{M}$  en tampón B, luego se midió la absorbancia a 412 nm y se comparó el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de Cys. La concentración deducida de Cys libre en la muestra de prueba se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la razón.

##### (b) Preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco

Antes de la conjugación con los grupos de unión de fármaco por medio de Cys, se redujo el anticuerpo con clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina ("TCEP"). En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón B con la cantidad apropiada de una disolución 5 mM de TCEP en agua para mantener el agente reductor en un exceso de 2,5 veces con respecto al anticuerpo. Se incubó la mezcla y se agitó durante 60 min a 20°C y después de eso se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo reducido resultante para calcular la razón Cys libre con respecto a anticuerpo, mientras que la muestra restante se mezcló con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del grupo de unión de fármaco (compuesto 1 para ADC14 o compuesto 12 para ADC15) en DMSO para alcanzar un exceso de 6 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el anticuerpo reducido presenta habitualmente menos de 6 Cys libres por molécula de proteína, la razón molar del compuesto con respecto a la Cys libre accesible nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v) y se incubó la mezcla durante 30 min a 20°C. Después de eso, se añadió *N*-acetil-cisteína para extinguir la reacción, usando el volumen apropiado de una disolución 10 mM en agua para hacer coincidir la concentración del grupo de unión de fármaco. El conjugado resultante se purificó finalmente del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular analítica usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 1 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspín de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

#### Ejemplo 18

Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco ADC 16 y 17 con anti-CD4 y los compuestos 1 y 12

(a) Procedimientos generales

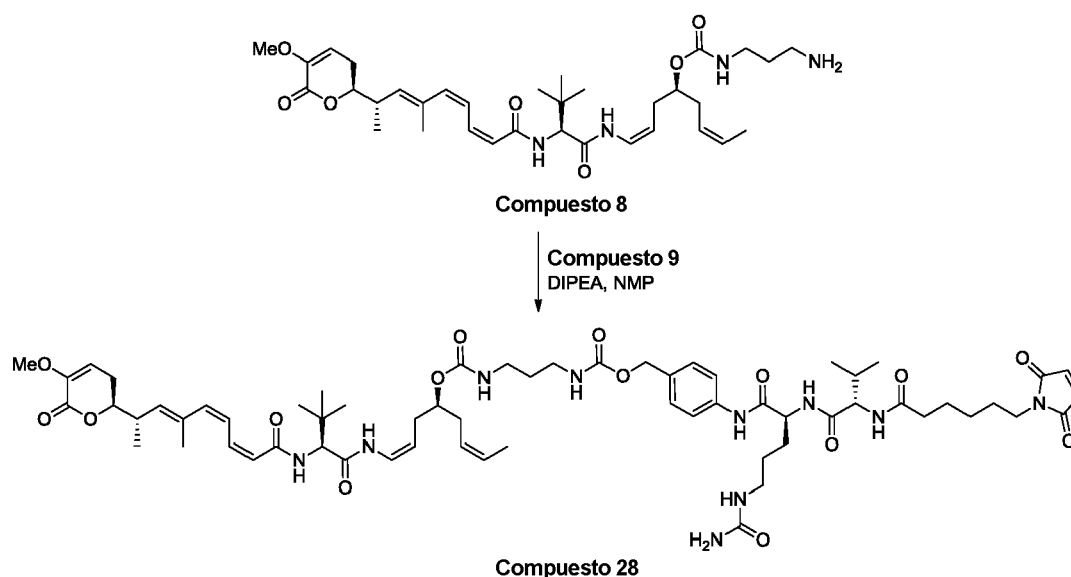
Se comprobó de manera espectrofotométrica la concentración de anticuerpo monitorizando su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de  $2,25E5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y un peso molecular de 150 kDa. Los tampones usados en estos procedimientos fueron o bien el tampón B (fosfato de sodio 50 mM pH 8,0) o bien el tampón fosfato salino ("PBS"). Se dedujo la razón fármaco con respecto a anticuerpo ("DAR") de la razón Cys libre por mol de anticuerpo, suponiendo que la reacción de conjugación del grupo de unión de fármaco con Cys libre fue cuantitativa. La determinación se basó en la reacción colorimétrica de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") con grupos tiol libres para formar un aducto de tionitrobenzoato coloreado. Se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de la muestra de prueba con 150  $\mu\text{l}$  de DTNB 133  $\mu\text{M}$  en tampón B, luego se midió la absorbancia a 412 nm y se comparó el valor resultante con aquellos obtenidos a partir de una curva de calibración usando concentraciones conocidas de Cys. La concentración deducida de Cys libre en la muestra de prueba se denomina entonces la concentración de anticuerpo para calcular la razón.

(b) Preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco

Antes de la conjugación con los grupos de unión de fármaco por medio de Cys, se redujo el anticuerpo con clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina ("TCEP"). En resumen, se mezcló una disolución 70  $\mu\text{M}$  (10,5 mg/ml) del anticuerpo en tampón B con la cantidad apropiada de una disolución 5 mM de TCEP en agua para mantener el agente reductor en un exceso de 2,5 veces con respecto al anticuerpo. Se incubó la mezcla y se agitó durante 60 min a 20°C y después de eso se retiró una pequeña alícuota del anticuerpo reducido resultante para calcular la razón Cys libre con respecto a anticuerpo, mientras que la muestra restante se mezcló con el volumen apropiado de una disolución 10 mM del grupo de unión de fármaco (compuesto 1 para ADC16 o compuesto 12 para ADC17) en DMSO para alcanzar un exceso de 6 veces del compuesto con respecto al anticuerpo: considerando que el anticuerpo reducido presenta habitualmente menos de 6 Cys libres por molécula de proteína, la razón molar del compuesto con respecto a la Cys libre accesible nunca está por debajo de 1. Se añadió DMSO si era necesario para mantener su concentración al 5% (v/v) y se incubó la mezcla durante 30 min a 20°C. Después de eso, se añadió *N*-acetil-cisteína para extinguir la reacción, usando el volumen apropiado de una disolución 10 mM en agua para hacer coincidir la concentración del grupo de unión de fármaco. El conjugado resultante se purificó finalmente del resto de los reactivos mediante filtración en gel en Sephadex G-25 usando columnas PD-10 de GE Healthcare. La presencia de agregados se comprobó mediante cromatografía de exclusión molecular usando un sistema Äkta FPLC equipado con una columna Superdex-100 10/300 que ejecuta un método isocrático con PBS a 1 ml/min: si el área del pico correspondiente a los agregados superaba el 10% del área de pico total, se purificaron monómeros usando el mismo sistema de cromatografía con una columna preparativa Superdex 200 16/600 ejecutando el mismo método descrito anteriormente. Se determinó de manera espectrofotométrica la concentración de ADC final monitorizando su absorbancia a 280 nm usando el mismo coeficiente de extinción molar que el del anticuerpo parental: si la concentración de ADC estaba por debajo de 1 mg/ml, se concentró usando dispositivos Vivaspín de GE Healthcare y de nuevo se determinó la nueva concentración tal como anteriormente.

Ejemplo 19 Síntesis de un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub>

Preparación del compuesto 28



## (a) Preparación del compuesto 28

Se añadió DIPEA (10  $\mu$ l, 0,06 mmol) a una disolución del compuesto 9 (13 mg, 0,02 mmol), preparado tal como se mostró en el ejemplo preparativo anterior, y compuesto 8 (20 mg, 0,02 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 2 anterior, en NMP (6,5 ml) a 23°C. Después de 9 h se diluyó la mezcla de reacción con H<sub>2</sub>O y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, DCM:CH<sub>3</sub>OH, desde 100:0 hasta 90:10) para dar el compuesto 28 objetivo puro (9 mg, 38%).

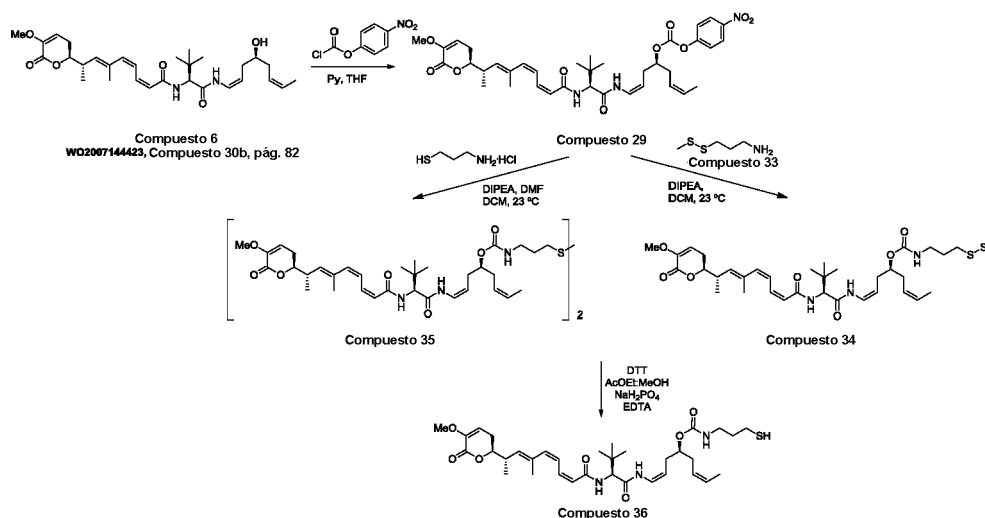
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  9,40 (s, 1H), 8,92 (d,  $J$  = 10,6 Hz, 1H), 7,67 (d,  $J$  = 7,7 Hz, 1H), 7,47 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 2H), 7,21 (d,  $J$  = 7,9 Hz, 2H), 7,16 (t,  $J$  = 11,9 Hz, 1H), 6,97 (t,  $J$  = 9,6 Hz, 2H), 6,82 (t,  $J$  = 11,4 Hz, 1H), 6,67-6,64 (m, 1H), 6,64 (s, 2H), 6,08 (d,  $J$  = 11,7 Hz, 1H), 5,68 (d,  $J$  = 11,4 Hz, 1H), 5,62-5,58 (m, 1H), 5,54-5,47 (m, 1H), 5,35-5,29 (m, 1H), 5,20 (d,  $J$  = 9,9 Hz, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,77 (q,  $J$  = 8,1 Hz, 1H), 4,54-4,45 (m, 2H), 4,37 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 1H), 4,20-4,12 (m, 1H), 4,08 (t,  $J$  = 7,8 Hz, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,42 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 2H), 3,18-3,00 (m, 7H), 2,81-2,75 (m, 1H), 2,35-2,30 (m, 3H), 2,29-2,25 (m, 3H), 2,17 (t,  $J$  = 7,2 Hz, 2H), 2,14-2,06 (m, 1H), 2,04-1,92 (m, 1H), 1,86-1,74 (m, 1H), 1,76 (s, 3H), 1,61-1,42 (m, 10H), 1,54 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 3H), 1,30-1,14 (m, 4H), 1,08 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H), 0,94 (s, 9H), 0,86 (dd,  $J$  = 6,8, 4,3 Hz, 6H).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  173,0, 172,1, 171,0, 170,2, 168,5, 167,1, 162,0, 161,3, 157,2, 157,0, 145,0, 140,2, 137,7, 137,5, 137,1, 134,0, 132,4, 128,8, 126,9, 124,9, 124,4, 124,3, 124,0, 120,5, 119,8, 108,6, 107,3, 81,9, 74,8, 66,1, 60,4, 58,8, 55,4, 37,6, 37,2, 36,0, 34,8, 31,9, 31,6, 30,9, 30,7, 30,0, 29,7, 29,3, 28,1, 26,5, 26,2, 26,1, 25,1, 19,2, 18,3, 17,1, 16,5, 12,9.

ESI-EM  $m/z$ : calculado para C<sub>63</sub>H<sub>90</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub>: 1226,7. Encontrado: 1267,4 (M+H)<sup>+</sup>.

Ejemplo 20 Síntesis de un compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>W</sub>-H

## Preparación del compuesto 36

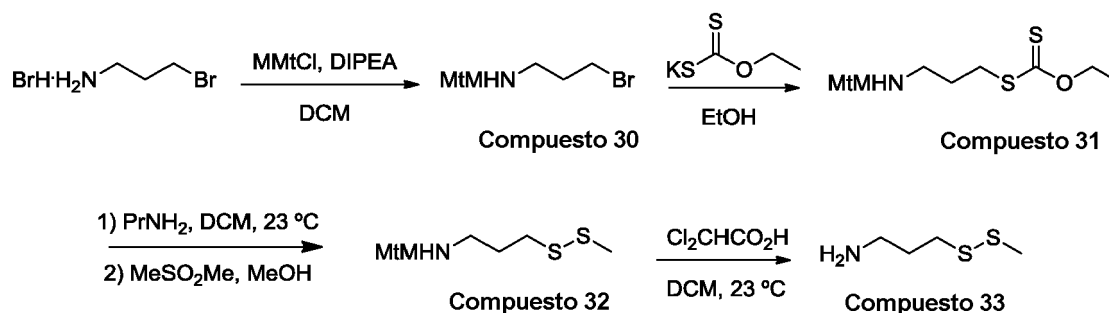


## (a) Preparación del compuesto 29

A una disolución del compuesto 6 (1,01 g, 1,91 mmol) (compuesto 30b, preparado tal como se describe en el documento WO 2007144423) en DCM (40 ml) se le añadieron piridina (0,31 ml, 3,82 mmol) y cloroforniato de 4-nitrofenilo (769,7 mg, 3,82 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 1,5 h, se diluyó con ácido cítrico al 10% y se extrajo con DCM. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 29 puro (783 mg, 59%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,26 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 8,02 (d,  $J$  = 10,9 Hz, 1H), 7,43 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 7,22 (t,  $J$  = 9,2 Hz, 1H), 6,92-6,76 (m, 2H), 6,21 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H), 6,17-6,12 (m, 1H), 5,73-5,64 (m, 1H), 5,65-5,56 (m, 2H), 5,46-5,38 (m, 1H), 5,27 (d,  $J$  = 9,9 Hz, 1H), 4,86 (q,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 4,76 (p,  $J$  = 6,2 Hz, 1H), 4,40 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 1H), 4,21 (ddd,  $J$  = 10,7, 7,6, 4,9 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,89-2,79 (m, 1H), 2,59-2,29 (m, 6H), 1,83 (d,  $J$  = 1,3 Hz, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,16 (d,  $J$  = 6,7 Hz, 3H), 1,00 (s, 9H).

## (b) Preparación del compuesto 33



## Preparación del compuesto 30

A una disolución de bromhidrato de 3-bromopropilamina (1,22 g, 2,98 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) se le añadió cloruro de 4-metoxitriphenilmetilo (5,89 g, 19,1 mmol) y DIPEA (6,3 ml, 36,38 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche, se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 30 puro (8,16 g, 100%) como un sólido blanco.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,50-7,42 (m, 4H), 7,39-7,33 (m, 2H), 7,29-7,22 (m, 4H), 7,22-7,15 (m, 2H), 6,81 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,56 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,26 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 2,07-1,96 (m, 2H).

## Preparación del compuesto 31

A una disolución del compuesto 30 (1,49 g, 3,63 mmol) en etanol (36 ml) se le añadió etilxantogenato de potasio (1,46 g, 9,08 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y luego se filtró el bromuro de potasio precipitado de la disolución. Después se evaporó el filtrado a presión reducida y se trituró el residuo sólido con hexano. Se eliminó el sólido resultante mediante filtración y se evaporó el filtrado y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 31 (1,31 g, 80%).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,50-7,42 (m, 4H), 7,39-7,33 (m, 2H), 7,29-7,22 (m, 4H), 7,22-7,15 (m, 2H), 6,81 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H), 4,62 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,32-3,20 (dd,  $J = 7,7, 6,9$  Hz, 2H), 2,23 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,91-1,80 (m, 2H), 1,41 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

## Preparación del compuesto 32

A una disolución del compuesto 31 (3 g, 6,64 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió 1-propilamina (4,4 ml, 66,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 10 min y se concentró a vacío. Se usó el residuo obtenido en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se disolvió en metanol seco (50 ml) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió metanotiosulfonato de metilo (9,7 ml, 7,97 mmol) y se agitó la disolución durante 16 h a 23°C. Se eliminó el disolvente a vacío, se disolvió el aceite residual en diclorometano, se lavó con tampón pH 7 y salmuera, se secó y se evaporó. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 32 (1,6 g, 59%).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,52-7,44 (m, 4H), 7,38 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H), 7,32-7,22 (m, 4H), 7,19 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 6,82 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,90-2,72 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,24 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,88 (p,  $J = 6,9$  Hz, 2H).

## Preparación del compuesto 33

A una disolución del compuesto 32 (1,22 g, 2,98 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) se le añadió ácido dicloroacético (0,9 ml, 10,9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 20 min y se diluyó con agua. Se extrajo la fase orgánica y se basificó la fase acuosa con KOH al 10%. Luego se extrajo concienzudamente con diclorometano (3x), y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron para dar el compuesto 33 (409 mg, 100%).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,83-2,75 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,88-1,81 (m, 2H).

## (c) Preparación del compuesto 34

A una disolución del compuesto 29 (230,2 mg, 0,33 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml), se le añadió compuesto 33 (50 mg, 0,36 mmol) y DIPEA (0,06 ml, 0,36 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 3 h, se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 34 puro (150 mg, 66%).



5  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,68 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 7,31 (t,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 6,90 (dd,  $J = 12,7, 10,2$  Hz, 1H), 6,81 (dd,  $J = 10,9, 8,5$  Hz, 1H), 6,38 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 6,16 (d,  $J = 11,7$  Hz, 1H), 5,69 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 5,65-5,52 (m, 3H), 5,41-5,37 (m, 1H), 5,29-5,56 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 4,83 (q,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,54-4,50 (m, 1H), 4,46 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 4,24-4,19 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,36-3,16 (m, 2H), 2,86-2,82 (m, 1H), 2,70 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,44-2,35 (m, 5H), 2,40 (s, 3H), 2,19-2,04 (m, 1H), 1,98-1,83 (m, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,63 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,16 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_2$ : 691,33. Encontrado: 692,4 (M+H) $^+$ .

(d) Preparación del compuesto 35

10 A una disolución del compuesto 29 (121,3 mg, 0,17 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en DCM (2,5 ml), se le añadieron una suspensión de clorhidrato de 3-aminopropano-1-tiol (37,2 mg, 0,29 mmol) en DCM (2,5 ml), DIPEA (59  $\mu\text{l}$ , 0,34 mmol) y DMF (0,1 ml) a 23°C. La mezcla de reacción que se agitó a 23°C durante 7 h, se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 35 puro (40,5 mg, 37%).

15  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,63 (d,  $J = 10,6$  Hz, 1H), 7,34- 7,21 (m, 1H), 6,88 (t,  $J = 11,4$  Hz, 1H), 6,76 (t,  $J = 9,6$  Hz, 1H), 6,68 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 6,13 (d,  $J = 11,6$  Hz, 1H), 5,7-5,67 (m, 3H), 5,66-5,48 (m, 3H), 4,81 (q,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 4,66-4,50 (m, 1H), 4,46 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 4,25-4,18 (m, 1H), 3,64 (s, 3H), 3,27-3,34 (m, 1H), 2,88-2,77 (m, 1H), 2,66 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,42-2,30 (m, 5H), 2,22-2,06 (m, 2H), 1,89-1,74 (m, 5H), 1,62 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,15 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

20 ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{68}\text{H}_{100}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_2$ : 1288,67. Encontrado: 1289,4 (M+H) $^+$ .

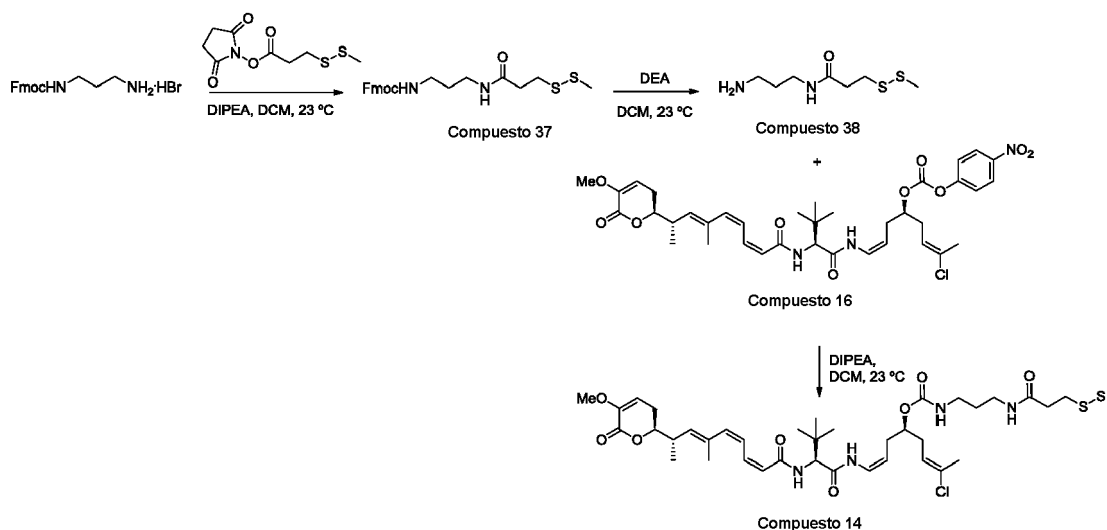
(e) Preparación del compuesto 36

25 Se trató una disolución del compuesto 35 (40,5 mg, 0,03 mmol) en una mezcla de EtOAc (1,5 ml) y  $\text{CH}_3\text{OH}$  (1,5 ml) con una disolución ditiotretiol (0,36 ml, 0,36 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (1,2 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a 23°C durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y el extrajo con EtOAc (x3). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para HPLC ( $\text{SiO}_2$ , mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 36 (15 mg, 38%).

30  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,70 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 7,35- 7,21 (m, 1H), 6,89 (t,  $J = 11,4$  Hz, 1H), 6,80 (t,  $J = 9,8$  Hz, 1H), 6,42 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 6,16 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H), 5,75-5,48 (m, 3H), 5,52-5,13 (m, 3H), 4,83 (q,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,65-4,38 (m, 2H), 4,32-4,16 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,29 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 2,85 (dt,  $J = 9,8, 6,9$  Hz, 1H), 2,54 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 2,48-2,26 (m, 5H), 2,19-2,01 (m, 1H), 1,89-1,74 (m, 5H), 1,63 (dd,  $J = 6,8, 1,7$  Hz, 3H), 1,16 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

ESI-EM  $m/z$ : calculado para  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ : 645,85. Encontrado: 668,4 (M+Na) $^+$ .

35 Ejemplo 21. Síntesis alternativa del compuesto 14



(a) Preparación del compuesto 37

5 A una disolución de bromhidrato de *N*-Fmoc-1,3-propanodiamina (377 mg, 1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) se le añadió DIPEA (0,52 ml, 3 mmol) y éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimidohexanoico (323,7 mg, 1,1 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante la noche y se concentró a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 37 puro (430 mg, 100%) como un sólido blanco.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,76 (dd, *J* = 7,6, 1,0 Hz, 2H), 7,64-7,55 (m, 2H), 7,45-7,37 (m, 2H), 7,31 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 2H), 6,16 (s a, 1H), 5,24 (s a, 1H), 4,42 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 4,21 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 3,27 (dq, *J* = 18,3, 6,3 Hz, 4H), 2,99 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,62 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,71-1,59 (m, 2H).

(b) Preparación del compuesto 38

10 A una disolución de 37 (430 mg, 1 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (a) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml) se le añadió dietilamina (1,4 ml, 13,5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 6 h y se concentró a vacío. Se trituró el residuo obtenido con Et<sub>2</sub>O y se filtró para obtener el compuesto 38 (148 mg, 71%) como un sólido blanco.

15 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,29 (td, *J* = 6,5, 2,3 Hz, 2H), 3,01-2,86 (m, 2H), 2,78 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,57 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,37 (s, 3H), 1,69 (p, *J* = 6,6 Hz, 2H).

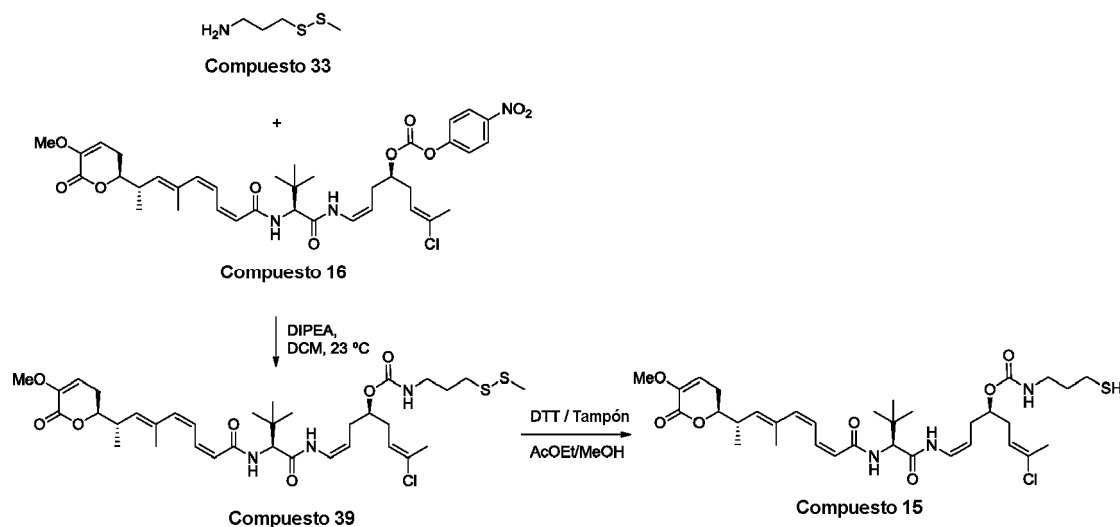
(c) Preparación del compuesto 14

20 A una disolución del compuesto 16 (60 mg, 0,08 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 5(a) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml), se le añadió una disolución del compuesto 38 (58 mg, 0,28 mmol), preparado tal como se describió en la etapa (b) anterior, y DIPEA (0,1 ml, 0,56 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 3 h, se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 14 puro (60,5 mg, 95%).

25 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,88 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 7,29-7,24 (m, 1H), 6,90 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,63 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,16 (dd, *J* = 11,5, 1,5 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 5,68-5,51 (m, 3H), 5,29 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H), 4,81 (q, *J* = 8,2 Hz, 1H), 4,52 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 4,52-4,43 (m, 1H), 4,24 (ddd, *J* = 11,5, 7,3, 4,3 Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,37-3,21 (m, 3H), 3,21-3,12 (m, 1H), 2,97 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,90-2,81 (m, 1H), 2,60 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,49-2,35 (m, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,33 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,14-2,07 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,84 (s, 3H), 1,73-1,64 (m, 2H), 1,16 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,05 (s, 9H).

30 <sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171,6, 168,2, 166,4, 161,6, 157,2, 145,2, 140,3, 137,4, 134,2, 134,0, 131,9, 124,4, 124,1, 122,4, 120,7, 108,3, 105,6, 81,8, 74,8, 60,6, 60,4, 55,5, 37,8, 37,2, 36,2, 35,6, 34,7, 33,1, 31,0, 29,8, 26,7, 26,2, 23,0, 21,0, 17,2, 16,6.

#### Ejemplo 22. Síntesis alternativa del compuesto 15



(a) Preparación del compuesto 39

35 A una disolución del compuesto 16 (178,7 mg, 0,25 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 5(a) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml), se le añadió compuesto 33 (120 mg, 0,88 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 20(b) anterior, y DIPEA (0,05 ml, 0,25 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 23°C durante 2 h, se diluyó con H<sub>2</sub>O y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y

se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 39 puro (100 mg, 56%).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,65 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,28 (t, *J* = 11,6 Hz, 1H), 6,90 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,17 (d, *J* = 11,7 Hz, 1H), 5,69 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 5,64-5,57 (m, 2H), 5,34 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,81 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,54-4,49 (m, 1H), 4,45 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 4,28-4,17 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,37-3,21 (m, 2H), 2,85 (dt, *J* = 9,7, 6,9 Hz, 1H), 2,71 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,44-2,30 (m, 5H), 2,38 (s, 3H), 2,13-2,06 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 1,93 (p, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,84 (s, 3H), 1,16 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,06 (s, 9H).

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>: 725,9. Encontrado: 748,3 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### 10 (b) Preparación del compuesto 15

Se trató una disolución del compuesto 39 (90 mg, 0,12 mmol), preparado tal como se describió en el ejemplo 5(a) anterior, en una mezcla de EtOAc (6,7 ml) y CH<sub>3</sub>OH (6,7 ml) con una disolución de diotretitol (0,36 ml, 0,36 mmol) en tampón fosfato de potasio 0,05 M (6,7 ml) a pH 7,5 que contenía ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM. Se agitó la mezcla a 23°C durante 4 h. Se trató la reacción con una disolución de tampón fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y el extrajo con EtOAc (x3). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo obtenido en un sistema para cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, mezclas de Hex:EtOAc) para dar el compuesto 15 objetivo puro (40,2 mg, 46%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,66 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,29 (t, *J* = 11,2 Hz, 1H), 6,91 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,83 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 6,38 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,17 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 11,4 Hz, 1H), 5,65-5,51 (m, 2H), 5,34 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 10,0 Hz, 1H), 4,82 (q, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,56-4,48 (m, 1H), 4,45 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 4,22 (ddd, *J* = 11,4, 7,5, 4,3 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,31 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,88-2,83 (m, 1H), 2,55 (q, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,47-2,30 (m, 5H), 2,12-2,07 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,88-1,76 (m, 5H), 1,17 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H), 1,06 (s, 9H).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168,2, 166,2, 161,5, 156,7, 145,2, 140,2, 137,3, 134,2, 134,0, 132,0, 124,4, 124,2, 122,3, 120,8, 108,1, 105,5, 81,8, 74,5, 60,6, 55,4, 39,6, 37,3, 34,6, 33,9, 33,3, 30,8, 26,7, 26,3, 21,8, 21,1, 17,2, 16,7.

ESI-EM *m/z*: calculado para C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S: 679,3. Encontrado: 702,4 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### Ejemplos que demuestran la citotoxicidad de los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente invención

##### *Bioensayos para la detección de actividad antitumoral*

El objetivo del ensayo fue evaluar la actividad citostática (capacidad para retrasar o detener el crecimiento de células tumorales) o citotóxica (capacidad para destruir células tumorales) *in vitro* de las muestras que están sometándose a prueba.

##### *Líneas celulares y cultivos celulares*

Todas las líneas de células tumorales usadas en este estudio se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), a menos que se indique lo contrario; BT-474 (ATCC HTB-20, carcinoma ductal de mama), SK-BR-3 (ATCC HTB-30, adenocarcinoma de mama) y HCC-1954 (ATCC CRL-2338, carcinoma ductal de mama), todo HER2+; MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, adenocarcinoma de mama) y MCF-7 (ATCC HTB-22 adenocarcinoma de mama, efusión pleural), todo HER2-; SK-OV-3 (ATCC HTB-77, adenocarcinoma de ovario), HER2+; NB-4 (leucemia promielocítica aguda, APL, CD13+, M. Lanotte *et al.* (1991) NB4, un marcador de línea celular inducible de maduración con t(15;17) asilado de una leucemia promielocítica aguda humana (M3). Blood 77, 1080-1086), (CD13+) y U937 (ATCC CRL-1593,2, linfoma histiocítico, CD13+ y CD4+); Raji (ATCC CCL-86, linfoma de Burkitt) (CD13-, CD20+, CD5- y CD4-); RPMI-8226 (ATCC CRM-CCL-155, mieloma múltiple) (CD13-, CD20-, CD5- y CD4-); Karpas-299 (DSMZ ACC-31, linfoma no Hodgkin) (CD20-, CD5+ y CD4+); MOLT-4 (ATCC CRL-1582, leucemia linfoblástica aguda, CD5+). Además, los dos clones de células Raji (ATCC CCL-86, linfoma de Burkitt) usados en este estudio clon de Raji n.º 10 (alta expresión de CD5) y clon de Raji 18 (expresión de CD5 nula), fueron proporcionados por el Dr. Juan M. Zapata (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, España). Se mantuvieron las células a 37°C, el 5% de CO<sub>2</sub> y el 95% de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (para células MCF y MDA-MB-231), RPMI-1640 (para células SK-BR-3, HCC-1954, NB-4, U937, Raji, RPMI-8226, Karpas-299, MOLT-4, clon de Raji n.º 10 y clon de Raji n.º 18), RPMI-1640 + ITS al 1% (para células BT-474) o McCOyS (para células SK-OV-3), todos los medios complementados con suero bovino fetal al 10% (FCS) y estreptomycin y penicilina 100 unidades/ml.

##### *Ensayo de citotoxicidad*

Para células adherentes: se adaptó un ensayo colorimétrico usando sulforhodamina B (SRB) para medición cuantitativa de la citotoxicidad y el crecimiento celular, tal como se describe en V. Vichai y K. Kirtikara (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, 1, 1112-1116. En resumen, se

sembraron células en placas de microtitulación de 96 pocillos y se las dejó reposar durante 24 horas en medio libre de fármaco antes del tratamiento con vehículo solo o los compuestos indicados durante 72 horas. Para la cuantificación, se lavaron las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se fijaron durante 15 min en disolución de glutaraldehído al 1%, se aclararon dos veces con PBS, se tiñeron en disolución de SRB al 0,4%-ácido acético al 1% durante 30 min, se aclararon varias veces con disolución de ácido acético al 1% y se secaron al aire. Luego se extrajo SRB en disolución base trizma 10 mM y se midió la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro de microplacas. Se expresó la supervivencia celular como porcentaje de control, supervivencia celular sin tratar.

Para células en suspensión: se adaptó un ensayo metabólico convencional usando MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) para medición cuantitativa de la citotoxicidad y el crecimiento celular, tal como se describe en T. Mosmann (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Met., 65, 55-63. En resumen, se añadió disolución de MTT a los cultivos celulares a una concentración final de 0,5 mg/ml, y se incubaron durante de 1 a 4 horas a 37°C hasta que se forman cristales de formazán. El medio de cultivo se retira cuidadosamente de los cultivos celulares y cristales de formazán resuspendidos en 100 µl de DMSO. Después de mezclar para garantizar la solubilización, la cantidad de formazán (directamente proporcional, supuestamente, al número de células viables) se mide registrando cambios en la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de lectura de placas. Se expresó la supervivencia celular como porcentaje de control, supervivencia celular sin tratar.

El valor de  $CI_{50}$  se refiere a la concentración de compuesto que induce un 50% de muerte celular en comparación con la supervivencia celular de control.

Ejemplo de bioactividad 1 - Citotoxicidad de ADC1 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC1 junto con los compuestos citotóxicos originales 1 y 4 y trastuzumab, contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que sobreexpresan o no el receptor HER2, incluyendo BT-474, HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER). SK-OV-3, una línea de células de cáncer de ovario HER2+, también se incluyó en el estudio como modelo de células de tejido no mamario. Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad de trastuzumab*

En primer lugar, la citotoxicidad *in vitro* de trastuzumab se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. En curvas de DR por triplicado que oscilan entre 5,0E01 y 2,6E-03 µg/ml (3,4E-07 - 1,8E-11 M), en dos experimentos independientes, el trastuzumab estaba completamente inactivo, no alcanzando la  $CI_{50}$  en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2 (véase la tabla 3).

Tabla 3. Resumen de la citotoxicidad *in vitro* de trastuzumab

	Trastuzumab					
	Células mamarias					Células de ovario
	HER2+			HER2-		HER2+
	BT-474	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231	SK-OV-3
$CI_{50}$ (ug/ml)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
$CI_{50}$ (molar)	>3,44E-07	>3,44E-07	>3,44E-07	>3,44E-07	>3,44E-07	>3,44E-07

*Citotoxicidad del compuesto 4*

La citotoxicidad del compuesto intermedio 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 1E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,5E-07 a 3,9E-11 M).

La citotoxicidad de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue relativamente homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde 8,9E-05 hasta 1,7E-03 µg/ml (de 1,34E-10 a 2,6E-09 M), siendo el valor medio de  $CI_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 5,69E-04 µg/ml (8,57E-10 M). Además, la citotoxicidad del compuesto 4 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (véase la tabla 4).

Tabla 4. Resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

Compuesto 4					
-------------	--	--	--	--	--

	Células mamarias					Células de ovario
	HER2+			HER2-		HER2+
	BT-474	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231	SK-OV-3
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	1,74E-03	1,30E-04	8,90E-05	4,15E-04	3,10E-04	7,30E-04
CI <sub>50</sub> (molar)	2,62E-09	1,96E-10	1,34E-10	6,26E-10	4,68E-10	1,10E-09

*Citotoxicidad del compuesto 1*

5 La actividad del compuesto original 1 se sometió a ensayo usando las mismas condiciones que antes, desde 1E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,1E-07 a 3,0E-11 M). La citotoxicidad de este compuesto, en dos experimentos independientes, también fue relativamente homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar bajo, desde 8,9E-04 hasta 6,4E-03 µg/ml (de 1,04E-09 a 7,47E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 3,41E-03 µg/ml (3,98E-09 M). El grupo de unión de maleimida parecía disminuir ligeramente el efecto citotóxico del compuesto. De nuevo, la citotoxicidad del compuesto 1 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (véase la tabla 5).

Tabla 5. Resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1					
	Células mamarias					Células de ovario
	HER2+			HER2-		HER2+
	BT-474	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231	SK-OV-3
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	6,40E-03	9,60E-04	8,90E-05	3,70E-03	2,80E-03	5,70E-03
CI <sub>50</sub> (molar)	7,47E-09	1,12E-09	1,04E-09	4,32E-09	3,27E-09	6,66E-09

10 *Citotoxicidad de ADC1*

La citotoxicidad de ADC1 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en seis curvas de DR por triplicado diferentes (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µg/ml (equivalente a 3,3E-07, 6,6E-08, 6,6E-09, 6,6E-10, 6,6E-11 y 6,6E-12 concentración molar), en dos experimentos independientes.

15 Se muestra una curva de DR representativa en la figura 3.

Después de ajustar las diferentes curvas de DR, se muestra el valor medio de CI<sub>50</sub> calculado para el ADC1 contra las diferentes líneas celulares en la tabla 6 a continuación. ADC1 mostró una citotoxicidad relativamente similar a la del compuesto original, el compuesto 1 solo y, de manera más importante, una clara especificidad contra células que expresan HER2+. Se supone, por tanto, que el conjugado actuaba en realidad a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana sobre las células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana. Entre las líneas celulares positivas para HER2, hubo diferencias significativas en la sensibilidad contra ADC1. Las líneas celulares más sensibles fueron HCC-1954 y SK-BR-3, que muestran CI<sub>50</sub> de 3,88E-02 y 2,45E-02 µg/ml (equivalente a 2,581E-10 y 1,63E-10 M), seguido de células BT-474, que mostraron un valor significativamente mayor de CI<sub>50</sub> de 7,4E-01 µg/ml (equivalente a 4,93E-09 M). La línea de células de ovario SKOV-3 mostró un valor incluso mayor de CI<sub>50</sub> de 7,0E+00 µg/ml (equivalente a 4,67E-08 M). Las dos células negativas para HER mostraron una sensibilidad similar en el orden de 2,0E+01 µg/ml (equivalente a alrededor de 1,0E-07 M) (véase la tabla 6).

Tabla 6. Resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC1

Compuesto ADC1						
Línea celular	Células mamarias					Células de ovario
	HER2+			HER2-		HER2+
Estado de HER2	BT-474	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231	SK-OV-3

Compuesto ADC1						
CI50 (ug/ml)	7,40E-01	3,88E-02	2,45E-02	1,20E+01	2,00E+01	7,00E+00
CI50 media (ug/ml) de células positivas (mama) para HER2						2,68E-01
CI50 media (ug/ml) de células negativas (mama) para HER2						1,60E+01
CI50 (M)	4,93E-09	2,58E-10	1,63E-10	7,97E-08	1,33E-07	4,67E-08
CI50 media (M) de células positivas (mama) para HER2						1,79E-09
CI50 media (M) de células negativas (mama) para HER2						1,07E-07

Por tanto, las líneas celulares positivas para HER2 más reactivas fueron alrededor de 300-800 veces más reactivas que las líneas celulares negativas para HER2, lo que indica la especificidad del conjugado contra las células que expresan HER2.

5 Para comparar gráficamente la citotoxicidad del AcM trastuzumab solo con la del conjugado ADC1, se muestran  
 10 histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas  
 15 celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC a 10 ó 1 µg/ml en la figura 4. Tal como puede observarse a partir de la  
 figura 4, a una concentración igual de 10 µg/ml, el AcM trastuzumab solo mostró poca o ninguna citotoxicidad  
 (< 20% máx) contra cualquiera de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de  
 HER2. En cambio, ADC1 mostró una potente citotoxicidad contra las células que expresan HER2, HCC-1954 y SK-  
 BR-3 y, en un menor grado, BT-474 y SK-OV-3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del  
 88%, el 82%, el 52% y el 47% respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración,  
 ADC1 presentó alguna citotoxicidad contra las células negativas para HER MCF-7 y MDA-MB-231, con porcentajes  
 medios de inhibición de la supervivencia celular del 38% y el 32%, respectivamente. A una concentración de 1 µg/ml,  
 el conjugado ADC1 mostró una citotoxicidad algo similar contra las células positivas para HER2 a la observada a  
 10 µg/ml, pero en este caso sin efectos detectables en células negativas para HER2 (figura 4).

Estos resultados demostraron claramente la notable especificidad y citotoxicidad del conjugado ADC1 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 2 - Citotoxicidad de ADC2 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

20 Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC2, un ADC de trastuzumab-compuesto 5, junto con los compuestos  
 citotóxicos originales 5 y 8 y el AcM trastuzumab contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano  
 que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-  
 231 y MCF-7 (células negativas para HER). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante  
 72 horas.

25 *Citotoxicidad del compuesto 8*

La citotoxicidad del compuesto intermedio 8 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie  
 (razón 1/2,5) desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,6E-06 a 4,0E-10 M).

30 La citotoxicidad de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue relativamente homogénea junto las  
 diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 3,40E-03 hasta  
 6,75E-03 µg/ml (de 5,4E-09 a 1,0E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de  
 5,53E-03 µg/ml (equivalente a 8,79E-09 M). Además, la citotoxicidad del compuesto 8 fue independiente del estado  
 de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 7).

Tabla 7. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 8

	Compuesto 8			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (ug/ml)	5,40E-03	3,40E-03	6,75E-03	6,55E-03
CI50 (molar)	8,59E-09	5,41E-09	1,07E-08	1,04E-08

*Citotoxicidad del compuesto 5*

La actividad del compuesto 5, el compuesto 8 modificado que porta el grupo de unión de maleimida, se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,2E-06 a 3,1E-10 M).

La citotoxicidad de este compuesto, en dos experimentos independientes, también fue relativamente homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 1,9E-02 hasta 7,7E-02 µg/ml (de 2,32E-08 a 9,41 E- 08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 4,33E-02 µg/ml (5,26E-08 M). La presencia del grupo de unión de maleimida en el compuesto 5 disminuyó ligeramente la citotoxicidad del compuesto en comparación con el compuesto 8. Además, la citotoxicidad del compuesto 5 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 8).

Tabla 8. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 5

	Compuesto 5			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	1,95E-02	1,90E-02	7,75E-02	5,70E-02
CI <sub>50</sub> (molar)	2,38E-08	2,32E-08	9,41E-08	6,94E-08

10 *Citotoxicidad de ADC2*

La actividad citotóxica del ADC2 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Sólo para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en cinco intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa en la figura 5. Después de ajustar todas las diferentes curvas de DR, se muestran los valores medios de CI<sub>50</sub> calculados para el ADC2 contra las diferentes líneas celulares en la tabla 9. El conjugado ADC2 mostró especificidad contra las células que expresan HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3, en las que el compuesto demostró una citotoxicidad similar a la del compuesto original 5, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 5,8E+00 y 2,2E-01 µg/ml (equivalente a 4,0E-08 y 1,5E-09 M), respectivamente. Las dos líneas celulares de HER, MCF-7 y MDA-MB-231, no fueron reactivas prácticamente a ADC2 en el intervalo de concentraciones sometido a prueba, no alcanzando un valor de CI<sub>50</sub> (>5,0E+01 µg/ml) (véase la figura 5 y la tabla 9).

Se supone, por tanto, que el conjugado actuaba en realidad a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

25 Tabla 9. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC2 (ADC de trastuzumab-compuesto 5)

ADC2 (Trastuzumab-compuesto 5 ADC)				
Línea celular	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
Estado de HER2	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	5,80E+00	2,20E-01	>5,0E+01	>5,0E+01
CI <sub>50</sub> media (ug/ml) de células positivas para HER2				3,01E+00
CI <sub>50</sub> media (ug/ml) de células negativas para HER2				>5,0E+01
CI <sub>50</sub> (M)	4,00E-08	1,52E-09	>3,4E-07	>3,4E-07
CI <sub>50</sub> media (M) de células positivas para HER2				2,08E-08
CI <sub>50</sub> media (M) de células negativas para HER2				>3,4E-07

Para comparar gráficamente la citotoxicidad del trastuzumab solo con la del conjugado ADC2, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con trastuzumab solo (10 µg/ml) o el ADC a 10 ó 1 ug/ml en la figura 6. A una concentración de 10 µg/ml, el AcM trastuzumab solo no mostró citotoxicidad contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC2 presentó una citotoxicidad significativa

y específica contra células que expresan HER2 HCC-1954 y SK-BR-3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del 57% y el 78%, respectivamente, en comparación con las células de control.

A una concentración de 1 µg/ml, el conjugado ADC2 mostró una citotoxicidad algo similar contra las células positivas para HER2 a la observada a 10 µg/ml, de nuevo, sin efectos detectables en células negativas para HER2 (figura 6).

5 Estos resultados demostraron claramente la notable especificidad y citotoxicidad de conjugado ADC2 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 3 – Citotoxicidad de ADC3 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

10 Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC3, junto con los compuestos citotóxicos originales 12 y 4 y el AcM trastuzumab contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad del compuesto 4*

15 La citotoxicidad del compuesto original 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01 E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-07 a 3,9E-12 M).

20 La citotoxicidad del compuesto 4, en dos experimentos independientes, fue homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo picomolar, desde 1,16E-04 hasta 2,80E-04 µg/ml (de 1,75E-10 a 4,23E-10 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,97E-04 µg/ml (equivalente a 2,96E-10 M). Además, la citotoxicidad del compuesto 4 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 10).

Tabla 10. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	1,20E-04	1,16E-04	2,80E-04	2,70E-04
CI <sub>50</sub> (molar)	1,81E-10	1,75E-10	4,23E-10	4,07E-10

*Citotoxicidad del compuesto 12*

25 La actividad del compuesto 12, el compuesto modificado 4 que porta el grupo de unión peptídico escindible, se sometió a ensayo en las mismas condiciones experimentales que antes, en el intervalo de concentraciones desde 01E+01 hasta 2,6E-03 µg/ml (de 7,9E-06 a 2,0E-09 M).

30 La citotoxicidad del compuesto 12, en dos experimentos independientes, también fue relativamente homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar bajo, desde 7,60E-03 hasta 3,05E-02 µg/ml (de 6,02E-09 a 2,42E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,63E-02 µg/ml (1,29E-08 M) (tabla 11). La presencia del grupo de unión peptídico en el compuesto 12 tuvo un efecto negativo sobre la citotoxicidad del compuesto, en comparación con el compuesto 4. La citotoxicidad del compuesto 12 fue más bien independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales.

Tabla 11. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 12

	Compuesto 12			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	7,60E-03	9,05E-03	3,05E-02	1,80E-02
CI <sub>50</sub> (molar)	6,02E-09	7,18E-09	2,42E-08	1,43E-08



*Citotoxicidad de ADC 3*

Finalmente, la citotoxicidad del ADC3 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en seis intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µg/ml (equivalente a 3,33E-07, 6,64E-08, 6,64E-09, 6,64E-10, 6,64E-11 y 6,64E-12 concentración molar), en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa en la figura 7. Los valores medios de CI<sub>50</sub> calculados para ADC3 contra las diferentes líneas celulares sometidas a prueba se muestran en la tabla 12.

El conjugado ADC3 mostró claramente una especificidad significativa contra células que expresan HER2+, en las que el compuesto demostró una potente citotoxicidad, similar a la del compuesto original 4 (aproximadamente 1 log más activo que el compuesto intermedio 12 que porta el grupo de unión peptídico). Ambas líneas celulares HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3, mostraron una sensibilidad comparable contra ADC3, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 8,83E-02 y 6,77 E-02 µg/ml (equivalente a 5,86E-10 y 4,49E-10 M), respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para HER, MCF-7 y MDA-MB-231, mostraron una sensibilidad significativamente menor contra ADC3, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 9,40E+00 y >5,0E+01 µg/ml (equivalente a alrededor de 6,24E-08 M y >3,32E-07 M), respectivamente.

La figura 8 es un diagrama de la citotoxicidad de ADC3 contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2. Se encontró que las líneas celulares HER2+ (CI<sub>50</sub> media 7,80E-02 µg/ml) fueron al menos >120 veces más reactivas a ADC3 que las células MCF-7 negativas para HER2 (CI<sub>50</sub> media 9,40E+00 µg/ml), y mucho más sensibles que las células MDA-MB-231, que muestran claramente la especificidad de ADC3 contra las células que expresan HER2 (figura 7 y tabla 12). Se supone, por tanto, que el conjugado actuaba en realidad a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 12. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC3 (trastuzumab-compuesto 12).

ADC3 (ADC trastuzumab-compuesto 12)				
Línea celular	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
Estado de HER2	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (ug/ml)	8,83E-02	6,77E-02	9,40E+00	>5,0E+01
CI <sub>50</sub> media (ug/ml) de células positivas para HER2				7,80E-02
CI <sub>50</sub> media (ug/ml) de células negativas para HER2				9,40E+00
IC <sub>50</sub> (M)	5,86E-10	4,49E-10	6,24E-08	>3,32E-07
CI <sub>50</sub> media (M) de células positivas para HER2				5,18E-10
CI <sub>50</sub> media (M) de células negativas para HER2				6,24E-08

Para comparar gráficamente la citotoxicidad del AcM trastuzumab, solo con la del conjugado ADC3, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC3 a 10 ó 1 µg/ml en la figura 8, que muestra la actividad citotóxica de trastuzumab frente a ADC3 contra diferentes líneas celulares de cáncer humano de mama.

A una concentración igual de 10 µg/ml, trastuzumab, solo, no mostró citotoxicidad contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC3 mostró una potente citotoxicidad contra las células que expresan HER2, HCC-1954 y SK-BR-3. En estas líneas celulares, ADC3 ejerció una inhibición de la supervivencia celular del 83% y el 84%, respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración, ADC3 también tuvo algún efecto sobre células negativas para HER2, MCF-7 y MDA-MB-231, produciendo una ligera inhibición de la supervivencia celular del 33% y el 20%, respectivamente. A una concentración de 1 µg/ml, el conjugado ADC3 mostró una citotoxicidad similar contra las células positivas para HER2 que la observada a 10 µg/ml, pero sin efectos detectables sobre células negativas para HER2 (figura 8). Estos resultados demostraron claramente la notable especificidad y citotoxicidad de ADC3 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 4 - Citotoxicidad de ADC4 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC4, junto con los compuestos citotóxicos originales 13 y 4 y el AcM trastuzumab contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER2). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

#### 5 Citotoxicidad del compuesto 4

La citotoxicidad del compuesto original compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 1E-01 hasta 2,6E-05  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,5E-07 a 3,0E-11 M)

La citotoxicidad del compuesto 4, en dos experimentos independientes, fue homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde 2,43E-04 hasta 4,45E-04  $\mu\text{g/ml}$  (de 3,6E-10 a 6,7E-10 M), siendo el valor medio de  $CI_{50}$  en todo el panel de la célula completa 3,3E-04  $\mu\text{g/ml}$  (equivalente a 4,98E-10 M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 4 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 13).

Tabla 13. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	2,98E-04	2,43E-04	4,45E-04	3,35E-04
$CI_{50}$ (molar)	4,49E-10	3,66E-10	6,71E-10	5,05E-10

#### Citotoxicidad del compuesto 13

15 La actividad del compuesto 13, el compuesto modificado 4 que porta el grupo que contiene tiol, se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 1E-01 hasta 2,6E-05  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,3E-07 a 2,0E-11 M)

La actividad citotóxica del compuesto 13, en dos experimentos independientes, también fue relativamente homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde 7,95E-04 hasta 2,63E-03  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,0E-09 a 3,5E-09 M), siendo el valor medio de  $CI_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,83E-03  $\mu\text{g/ml}$  (2,44E-09 M) (tabla 14). La presencia de la cola que contiene tiol en el compuesto 13 disminuyó ligeramente (aproximadamente 5 veces) la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 4. Además, la citotoxicidad del compuesto 13 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 14).

Tabla 14. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 13

	Compuesto 13			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,49E-03	7,95E-04	2,43E-03	2,63E-03
$CI_{50}$ (molar)	1,98E-09	1,06E-09	3,23E-09	3,50E-09

#### 25 Citotoxicidad de ADC4

La citotoxicidad del ADC4 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Sólo para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa en la figura 9. Después de ajustar todas las diferentes curvas de DR, los valores medios de  $CI_{50}$  calculados para ADC4 contra las diferentes líneas celulares sometidas a prueba se muestran en la tabla 15.

El conjugado ADC4 mostró especificidad contra las células que expresan HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3, en las que el compuesto demostró una potente citotoxicidad similar a la de los compuestos originales 4 y 13, con valores medios de  $CI_{50}$  de 1,17E-01 y 4,80E-02  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para HER, MCF-

7 y MDA-MB-231, mostraron una sensibilidad significativa menor contra ADC4, con valores medios de  $Cl_{50}$  de  $5,35E+00$  y  $6,50E+00$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Parecía que el conjugado estaba actuando preferentemente a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

5 Tabla 15. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC4.

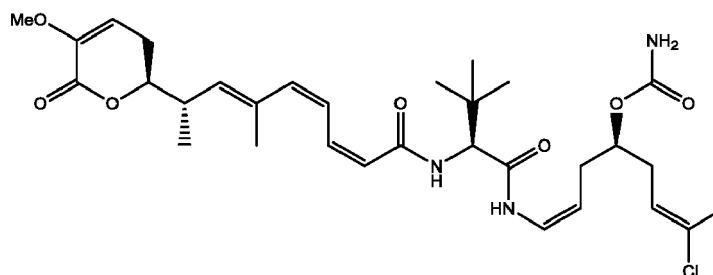
ADC 4				
Estado HER2	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
Línea celular	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,17E-01	4,80E-02	5,35E+00	6,50E+00
$Cl_{50}$ media ( $\mu\text{g/ml}$ ) de células positivas para HER2			8,24E-02	
$Cl_{50}$ media ( $\mu\text{g/ml}$ ) de células negativas para HER2			5,93E+00	

10 Para comparar gráficamente la citotoxicidad del AcM trastuzumab, solo con la del conjugado ADC4, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) o ADC4 a  $10$  ó  $1 \mu\text{g/ml}$  en la figura 10. A una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$ , el AcM trastuzumab solo, no mostró citotoxicidad contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC4 presentó una citotoxicidad significativa y específica contra las células que expresan HER2, HCC-1954 y SK-BR- 3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del 80% y el 75%, respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración, ADC4 también tuvo efecto sobre células negativas para HER2, MCF-7 y MDA-MB-231, produciendo una inhibición de la supervivencia celular del 53% y el 40%, respectivamente. A una concentración de  $1 \mu\text{g/ml}$ , el conjugado ADC4 mostró una citotoxicidad algo similar contra las células positivas para HER2 que la observada a  $10 \mu\text{g/ml}$ , pero sin efectos detectables sobre células negativas para HER2 (figura 10). Estos resultados demostraron claramente la notable especificidad y citotoxicidad del conjugado ADC4 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

20 Ejemplo de bioactividad 5 - Citotoxicidad de ADC5 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2.

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC5 junto con los compuestos citotóxicos originales 15 y 40, contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER).

*Citotoxicidad del compuesto 40*



25 Se preparó el compuesto 40 tal como se describe en el documento WO2007144423 (compuesto 1 en dicha solicitud de patente).

La citotoxicidad del compuesto original 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde  $1E-02$  hasta  $2,6E-06$   $\mu\text{g/ml}$  (de  $1,65E-08$  a  $4,29E-12$  M).

30 La citotoxicidad del compuesto 40, en dos experimentos independientes, fue muy homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde  $4,90E-05$  hasta  $1,73E-04$   $\mu\text{g/ml}$  (de  $8,10E-11$  a  $2,84E-10$  M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de  $1,06E-04$   $\mu\text{g/ml}$  (equivalente a  $1,75E-10$  M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 16).

Tabla 16. Datos de resumen de la citotoxicidad in vitro del Compuesto 40.

	Compuesto 40			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (µg/ml)	7,05E-05	4,90E-05	1,32E-04	1,73E-04
CI50 (molar)	1,16E-10	8,10E-11	2,18E-10	2,84E-10

*Citotoxicidad del compuesto 15*

La actividad del compuesto 15, el compuesto modificado 40 que porta el grupo que contiene tiol, se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 1E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,47E-07 a 3,82E-11 M).

- 5 La citotoxicidad del compuesto 15, en dos experimentos independientes, también fue bastante homogénea junto las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 4,80E-04 hasta 1,49E-03 µg/ml (de 7,06E-10 a 2,19E- 09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,03E-03 µg/ml (1,51E-09 M). La presencia de la cola que contiene tiol en el compuesto 15 disminuyó ligeramente (aproximadamente 8 veces) la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 40. Además, la
- 10 citotoxicidad del compuesto 15 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales. (tabla 17)

Tabla 17 Datos de resumen de la citotoxicidad in vitro del Compuesto 15

	Compuesto 15			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (µg/ml)	6,75E-04	4,80E-04	1,45E-03	1,49E-03
CI50 (molar)	9,94E-10	7,06E-10	2,14E-09	2,19E-09

*Citotoxicidad de ADC 5*

- 15 La citotoxicidad del ADC5 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Sólo para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, 1 /2,5 ratio) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 11. Después de ajustar todas las diferentes curvas de DR, los valores medios de CI<sub>50</sub> calculados para el ADC5 contra las diferentes líneas celulares sometidas a prueba se muestran en la tabla 18.

- 20 El conjugado ADC5 mostró especificidad contra las células que expresan HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3, en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica similar a la de los compuestos originales compuesto 40 y compuesto 15, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 1,13E-01 y 4,61E-02 µg/ml, respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para HER, MCF-7 y MDA-MB-231, mostraron una sensibilidad significativamente menor contra ADC5, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 1,23E+00 y 1,45E+00 µg/ml, respectivamente.

- 25 Parecía que el conjugado ADC5 estaba actuando preferentemente a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 18. Datos de resumen de la citotoxicidad in vitro de ADC5.

ADC5				
Estado de HER2	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
IC50 (µg/ml)	1,13E-01	4,61E-02	1,23E+00	1,45E+00

CI50 media (µg/ml) de células positivas para HER2		7,96E-02
CI50 media (µg/ml) de células negativas para HER2		1,34E+00

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM trastuzumab solo con la del conjugado ADC5, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC5 a 10 µg/ml o 1 µg/ml en la figura 12. A una concentración de 10 µg/ml, el AcM trastuzumab solo no mostró actividad de citotoxicidad contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC5 presentó una citotoxicidad significativa y específica contra células que expresan HER2, HCC-1954 y SKBR- 3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del 82% y el 72%, respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración, ADC5 también tuvo efecto sobre células negativas para HER2, MCF-7 y MDA-MB-231, produciendo una inhibición de la supervivencia celular del 58% y el 54%, respectivamente. A una concentración de 1 µg/ml, el conjugado ADC5 mostró una actividad citotóxica relativamente similar contra las células positivas para HER2 que la observada a 10 µg/ml (el 77% y el 75%, respectivamente), pero mucho menos actividad contra células negativas para HER2, con una inhibición de la supervivencia celular del 24% y el 15%, respectivamente (figura 12). Estos resultados demostraron la notable actividad citotóxica y especificidad relativa del conjugado ADC5 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 6 - Citotoxicidad de ADC6 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC6 junto con los compuestos citotóxicos originales 18 y 8 contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER2). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante horas.

*Citotoxicidad del compuesto 8*

La citotoxicidad del compuesto original 8 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 1E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,59E-06 a 4,13E-10 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue relativamente homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba (ligeramente más activas contra células SK-BR-3), con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar bajo, desde 1,85E-03 hasta 9,50E-03 µg/ml (de 2,94E-09 a 1,51 E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 5,45E-03 µg/ml (equivalente a 8,67E-09 M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 8 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 19).

Tabla 19. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 8

	Compuesto 8			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (µg/ml)	5,20E-03	1,85E-03	9,50E-03	5,25E-03
CI50 (molar)	8,27E-09	2,94E-09	1,51E-08	8,35E-09

*Citotoxicidad del compuesto 18*

La actividad del compuesto 18, el compuesto modificado 8 que porta el grupo que contiene tiol, se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 1E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,39E-06 a 3,63E-10 M). La citotoxicidad de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue también bastante homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 4,40E-03 hasta 1,85E-02 µg/ml (de 6,14E-09 a 2,58E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,06E-02 µg/ml (1,48E-08 M). La presencia de la cola que contiene tiol en el compuesto 18 tuvo poco efecto sobre la actividad del compuesto, en comparación con el compuesto 8. Además, la citotoxicidad del compuesto 18 parecía ser más bien independiente del estado de HER2 de la línea de células tumorales (tabla 20).

Tabla 20. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 18

	Compuesto 18

	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (µg/ml)	8,05E-03	4,40E-03	1,85E-02	1,15E-02
CI50 (molar)	1,12E-08	6,14E-09	2,58E-08	1,60E-08

#### Citotoxicidad de ADC6

La citotoxicidad del ADC6 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Sólo para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, 1 /2,5 ratio) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una DR representativa en la figura 13. Después de ajustar todas las diferentes curvas de DR, los valores medios de CI<sub>50</sub> calculados para ADC6 contra las diferentes líneas celulares sometidas a prueba se muestran en la tabla 21.

El conjugado ADC6, aunque limitado, mostró algo de especificidad hacia células que expresan HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3. En estas líneas celulares, el conjugado fue ligeramente menos citotóxico que los compuestos originales 8 y 18 solos (5,6 y 3,2 veces respectivamente), con valores medios de CI<sub>50</sub> de 1,04 E+01 y 3,80E+00 µg/ml, respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para HER, MCF-7 y MDA-MB-231, mostró una sensibilidad ligeramente menor contra ADC6 (5 veces menos), con valores medios de CI<sub>50</sub> de 3,50E+01 y 4,40E+01 µg/ml, respectivamente. Parecía que el conjugado ADC6 tenía alguna preferencia por células que expresan HER2, actuando a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 21. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC6.

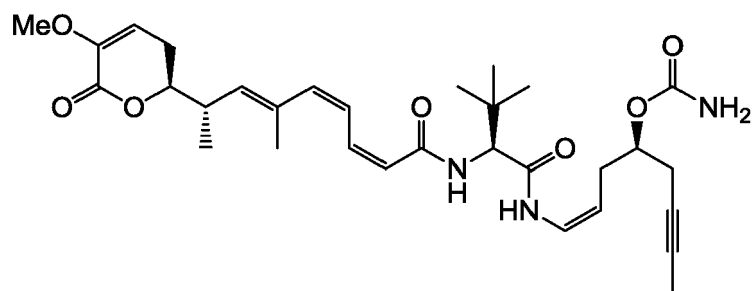
ADC6				
Estado de HER2	HER2+		HER2-	
Línea celular	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI50 (µg/ml)	1,04E+01	3,80E+00	3,50E+01	4,40E+01
CI50 media (µg/ml) de células positivas para HER2				7,12E+00
CI50 media (µg/ml) de células negativas para HER2				3,95E+01

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM trastuzumab solo con la del conjugado ADC6, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (10 µg/ml) o ADC6 a 10 ó 1 µg/ml en la figura 14. A una concentración de 10 µg/ml, el AcM trastuzumab solo no mostró actividad citotóxica contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC6 presentó citotoxicidad específica contra células que expresan HER2, HCC-1954 y SK-BR-3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del 57% y el 70%, respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración, ADC6 también tuvo un efecto residual sobre células negativas para HER2, MCF-7 y MDA-MB-231, produciendo una inhibición de la supervivencia celular del 9% y el 7%, respectivamente. A una concentración de 1 µg/ml, el conjugado ADC6 todavía tenía actividad citotóxica contra las células positivas para HER2, aunque menos que la observada a 10 µg/ml (el 19% y el 38%, respectivamente). A esta concentración, ADC6 fue completamente inactivo contra células negativas para HER2 (figura 14). Estos resultados demostraron la actividad citotóxica preferencial del conjugado ADC6 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

#### Ejemplo de bioactividad 7 - Citotoxicidad de ADC7 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de ADC7 junto con los compuestos citotóxicos originales 24, 25 y 41 contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER2). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

#### Citotoxicidad del compuesto 41



41

Se preparó el compuesto 41 tal como se describe en el documento WO 2009/080761 (compuesto 72 en dicha solicitud de patente).

5 La citotoxicidad del compuesto original 41 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 1E-02 hasta 2,6E-06  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,8E-08 a 4,6E-12 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $\text{CI}_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde 1,0E-04 hasta 2,6E-04  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,8E-10 a 4,6E-10 M), siendo el valor medio de  $\text{CI}_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,6E-04  $\mu\text{g/ml}$  (equivalente a 2,9E-10 M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 41 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 22)

Tabla 22. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 41.

	Compuesto 41			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,04E-04	1,10E-04	2,65E-04	1,80E-04
$\text{CI}_{50}$ (molar)	1,83E-10	1,93E-10	4,65E-10	3,16E-10

#### Citotoxicidad del compuesto 24

15 La actividad del compuesto 24 se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 1E+00 hasta 2,6E-04  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,6E-06 a 4,1E-10 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $\text{CI}_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 9,0E-03 hasta 1,8E-02  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,4E-08 a 2,8E-08 M), siendo el valor medio de  $\text{CI}_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,5E-02  $\mu\text{g/ml}$  (2,4E-08 M). La presencia del grupo 1,3-propilendiamina en el compuesto 24 disminuyó significativamente (aproximadamente 2 log) la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 41. Además, la citotoxicidad del compuesto 24 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 23).

Tabla 23. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 24.

	Compuesto 24			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,80E-02	9,00E-03	1,65E-02	1,75E-02
$\text{CI}_{50}$ (molar)	2,87E-08	1,44E-08	2,63E-08	2,79E-08

#### Citotoxicidad del compuesto 25

25 La actividad del compuesto 25, el compuesto modificado 24 que porta el grupo de unión de MC, se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 1E-01 hasta 2,6E-05  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,2E-07 a 3,2E-11 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $\text{CI}_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 2,5E-02 hasta

5,3E-02 µg/ml (de 3,1 E-08 a 6,5E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 4,1 E-02 µg/ml (4,9E-08 M). La presencia del grupo de unión de MC en el compuesto 25 disminuyó muy ligeramente la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 24, particularmente en células MDA-MB-231. La citotoxicidad del compuesto 25 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 24).

Tabla 24. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 25

	Compuesto 25			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	4,40E-02	2,55E-02	5,30E-02	>1,0E-01
CI <sub>50</sub> (molar)	5,37E-08	3,11E-08	6,46E-08	>1,22E-07

*Citotoxicidad de ADC7*

La citotoxicidad del ADC7 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. Sólo para garantizar el intervalo apropiado de concentraciones, el conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 10 µg/ml) en la figura 15. Después de ajustar todas las diferentes curvas de DR, los valores medios de CI<sub>50</sub> calculados para el ADC7 contra las diferentes líneas celulares se muestran en la tabla 25.

El conjugado ADC7 mostró especificidad contra las células que expresan HER2+, HCC-1954 y SK-BR-3, en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica casi similar a la del compuesto original 41, con valores medios de CI<sub>50</sub> de 3,7E-01 y 8,9E-02 µg/ml, respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para HER, MCF-7 y MDA-MB-231, no fueron reactivas prácticamente a ADC7. El conjugado parecía actuar a través de la interacción del AcM con el receptor HER2 asociado a la membrana en células tumorales positivas, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 25. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC7

ADC7				
Estado de HER2	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	3,75E-01	8,97E-02	>5,0E+01	>5,0E+01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para HER2				2,32E-01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para HER2				>5,0E+01

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM trastuzumab solo con la del conjugado ADC7, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC7 a 50 ó 1 µg/ml en la figura 16. A una concentración de 50 µg/ml, el AcM trastuzumab solo, no mostró actividad citotóxica significativa contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de HER2. En cambio, el conjugado ADC7 presentó una citotoxicidad significativa y específica contra células que expresan HER2, HCC-1954 y SKBR-3, induciendo una inhibición media de la supervivencia celular del 77% y el 76%, respectivamente, en comparación con las células de control. A esta concentración, ADC7 sólo tuvo un efecto residual sobre células negativas para HER2, MCF-7 y MDA-MB-231, produciendo una inhibición de la supervivencia celular del 13% y el 15%, respectivamente. Se detectó una actividad y especificidad similar a concentraciones menores de ADC7 (tan bajas como 1 µg/ml) en células HCC-1954 y SK-BR-3, produciendo una inhibición de la supervivencia celular del 68% y el 79%, respectivamente (figura 16). Juntos, estos resultados demostraron claramente la notable actividad citotóxica y especificidad del conjugado ADC7 contra células tumorales humanas que expresan HER2 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 8 - Citotoxicidad de ADC8 y reactivos relacionados contra células de cáncer de mama positivo y negativo para HER2



Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC8 junto con los compuestos citotóxicos originales 24, 27 y 41, contra diferentes líneas de células de cáncer de mama humano que expresan o no el receptor HER2, incluyendo HCC-1954 y SK-BR-3 (células positivas para HER2) y MDA-MB-231 y MCF-7 (células negativas para HER). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

5 *Citotoxicidad del compuesto 41*

La actividad citotóxica del compuesto original 41 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,8E-08 a 4,6E-12 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo, desde 7,5E-05 hasta 1,4E-04 µg/ml (de 1,3E-10 a 2,4E-10 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,1E-04 µg/ml (equivalente a 1,9E-10 M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 41 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 26).

Tabla 26. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 41

	Compuesto 41			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$Cl_{50}$ (µg/ml)	7,55E-05	8,05E-05	1,39E-04	1,35E-04
$Cl_{50}$ (Molar)	1,33E-10	1,41E-10	2,44E-10	2,36E-10

*Citotoxicidad del compuesto 24*

15 La actividad del compuesto 24 (se sometió a ensayo en las mismas condiciones que antes, desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,6E-06 a 4,1E-10 M). La actividad citotóxica de este compuesto, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 9,0E-03 hasta 1,8E-02 µg/ml (de 1,4E-08 a 2,9E-08 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,5E-02 µg/ml (2,4E-08 M). La presencia del grupo 1,3-propilendiamina en el compuesto 24 disminuyó significativamente (aproximadamente 2 log) la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 41. La citotoxicidad del compuesto 24 parecía ser independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 27).

Tabla 27. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 24

	Compuesto 24			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
$Cl_{50}$ (µg/ml)	1,80E-02	9,00E-03	1,65E-02	1,75E-02
$Cl_{50}$ (Molar)	2,87E-08	1,44E-08	2,63E-08	2,79E-08

*Citotoxicidad del compuesto 27*

25 La actividad del compuesto 27 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 1,4E-06 a 3,6E-10 M). La actividad citotóxica del compuesto 27, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo micromolar, desde 1,05E-02 hasta 3,9E-02 µg/ml (de 1,5E-08 a 5,5E-08 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 2,5E-02 µg/ml (3,5E-08 M). La presencia del grupo de unión de MPA en el compuesto 27 no tuvo ningún efecto significativo sobre la actividad citotóxica del compuesto en comparación con el compuesto 24. La actividad del compuesto 27 fue independiente del estado de HER2 de las líneas de células tumorales (tabla 28).

Tabla 28. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 27

	Compuesto 27			
	Células mamarias			

	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,65E-02	1,05E-02	3,90E-02	3,45E-02
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,31 E-08	1,47E-08	5,46E-08	4,83E-08

**Citotoxicidad de ADC8**

La actividad citotóxica del ADC8 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración máxima de 10 mg/ml) en la figura 17. ADC8 mostró algo de especificidad contra las células que expresan HER2+, particularmente en SK-BR-3, la línea celular más sensible. Excepto para estas células, que son alrededor de 4 veces más reactivas que células negativas para HER2 (CI<sub>50</sub> 2,3E-09M), ADC8 mostró similar actividad citotóxica, independiente de HER2, que el compuesto original 27, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar (tabla 29).

5

10 Tabla 29. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC8

	ADC8			
	Células mamarias			
	HER2+		HER2-	
	HCC1954	SK-BR3	MCF7	MDA-MB-231
CI <sub>50</sub> (µg / ml)	3,83E+00	6,37E-01	7,75E+00	1,02E+01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para HER2				2,23E+00
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para HER2				8,98E+00

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM trastuzumab solo con la del conjugado ADC8, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC8 (50 ó 10 µg/ml) en la figura 18. A 50 µg/ml, el AcM solo no tuvo actividad en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, excepto para SK-BR-3, en las que produjo una inhibición de la supervivencia celular de menos del 20%. ADC8, a su vez, no mostró especificidad significativa para las líneas celulares HER2+, produciendo una fuerte inhibición de la supervivencia celular de más del 60% en todas las células analizadas. A una concentración de 10 µg/ml, ADC8 mostró alguna, pero muy poca, especificidad contra células HER2+, produciendo una inhibición del 78% de la supervivencia celular en células HCC-1954 y SK-BR-3, ambas positivas para HER2, mientras tiene un efecto más pequeño sobre células negativas para HER2, el 59% y el 41%, en MCF7 y MDA-MB-231, respectivamente. Las células positivas para HER2 fueron, aproximadamente, entre 1,5 y 2 veces más reactivas a ADC8 que células negativas para HER2.

15

20

Ejemplo de bioactividad 9 - Citotoxicidad de ADC9 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD13

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC9 junto con los compuestos citotóxicos originales 1 y 4, contra diferentes líneas de células tumorales humanas que expresan o no el receptor CD13, incluyendo NB4 y U937 (células positivas para CD13) y Raji y RPMI-8226 (células negativas para CD13). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

25

*Citotoxicidad del anticuerpo monoclonal anti-CD13 de ratón*

En primer lugar, la actividad citotóxica *in vitro* del AcM anti-CD13 de ratón solo se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. En curvas de DR por triplicado que oscila entre 5,0E+01 y 1,3E-02 µg/ml (3,3E-07 - 8,7E-11 M), en dos experimentos independientes, el anticuerpo fue prácticamente inactivo, no alcanzando la CI<sub>50</sub> en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD13 (tabla 30).

30

Tabla 30. Datos de resumen de la actividad citotóxica *in vitro* del AcM de ratón antiCD13

	AcM de ratón antiCD13			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226

Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
Cl <sub>50</sub> (Molar)	>3,33E-07	>3,33E-07	>3,33E-07	>3,33E-07

*Citotoxicidad del compuesto 4*

5 La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4, en dos experimentos independientes, fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de Cl<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar bajo, desde 7,9E-05 hasta 2,65E-03 µg/ml (de 1,2E-10 a 4,0E-09 M), siendo el valor medio de Cl<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 8,4E-04 µg/ml (equivalente a 1,2E-09 M). Por tanto, la citotoxicidad del compuesto 4 fue más bien independiente del estado de CD13 de las líneas de células tumorales (tabla 31).

Tabla 31. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	7,93E-05	2,78E-04	2,65E-03	3,58E-04
Cl <sub>50</sub> (Molar)	1,20E-10	4,19E-10	4,00E-09	5,39E-10

10 *Citotoxicidad del compuesto 1*

15 La actividad del compuesto 1 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,1E-07 a 3,0E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 1, en dos experimentos independientes, fue algo homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de Cl<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 8,0E-04 hasta 6,3E-03 µg/ml (de 9,4E-10 a 7,3E-09 M), siendo el valor medio de Cl<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 2,8E-03 µg/ml (3,3E-09 M). La presencia del grupo de unión de maleimida en el compuesto 1 no altera muy significativamente la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 4. Además, la citotoxicidad del compuesto no estaba relacionada con el estado de CD13 de las líneas de células tumorales (tabla 32).

Tabla 32. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	8,05E-04	1,65E-03	6,25E-03	2,50E-03
Cl <sub>50</sub> (Molar)	9,39E-10	1,93E-09	7,31E-09	2,92E-09

20 *Citotoxicidad de ADC9*

La actividad citotóxica del ADC9 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración máxima 0,1 µg/ml) en la figura 19.

25 El conjugado ADC9 mostró una especificidad significativa contra células que expresan CD13+, en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica similar, o ligeramente superior a la de los compuestos originales 4 y 1. Ambas líneas celulares CD13+, NB4 y U937, mostraron una sensibilidad comparable contra ADC9, con valores medios de Cl<sub>50</sub> de 8,7E-03 y 2,4E-02 µg/ml, respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para CD13, Raji y RPMI-8226, mostraron una sensibilidad significativamente menor contra ADC9, con valores medios de Cl<sub>50</sub> de 1,6E+00 y 5,9E-01 µg/ml, respectivamente. En promedio, las líneas celulares CD13+ (Cl<sub>50</sub> media 1,66E-02 µg/ml) fueron alrededor de 65 veces más reactivas a ADC9 que las células CD13- (Cl<sub>50</sub> media 1,08E+00 µg/ml). Al comparar la actividad de ADC9 en células NB4 (las más sensibles) frente a células Raji (las menos sensibles); se encontró una diferencia de alrededor de 180 veces. Estos resultados mostraron claramente la especificidad del conjugado contra las células que expresan CD13 (tabla 33). Se supone, por tanto, que el ADC9 estaba, al menos en

parte, actuando a través de la interacción del AcM con el receptor CD13 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 33. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC9

	ADC9			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	8,75E-03	2,44E-02	1,57E+00	5,92E-01
Cl <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD13				1,66E-02
Cl <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD13				1,08E+00

5 Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM solo con la del conjugado ADC9, se muestran  
 10 histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas  
 celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o el ADC a 50 ó 0,1 µg/ml en la figura 20. A una concentración igual de  
 50 µg/ml, el anticuerpo anti-CD13 solo no mostró actividad citotóxica contra ninguna de las líneas celulares  
 sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD13. En cambio, el conjugado ADC9 mostró una  
 potente actividad citotóxica contra todas las líneas celulares, induciendo una inhibición de la supervivencia celular de  
 más del 80%. A una concentración de 0,1 µg/ml, el conjugado ADC9 mostró una actividad citotóxica similar contra  
 las células positivas para CD13 que la observada a 50 µg/ml, pero sin ningún efecto detectable sobre células  
 negativas para CD13. Estos resultados demostraron además la notable actividad citotóxica y especificidad de ADC9  
 contra células tumorales humanas que expresan CD13 *in vitro*.

15 Ejemplo de bioactividad 10 - Citotoxicidad de ADC10 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas  
 positivas y negativas para CD13

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC10 junto con los compuestos citotóxicos originales 12 y 4, contra  
 diferentes líneas de células tumorales humanas que expresan o no el receptor CD13, incluyendo NB4 y U937  
 (células positivas para CD13) y Raji y RPMI-8226 (células negativas para CD13). Se realizaron curvas de calibración  
 de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

#### 20 Citotoxicidad del compuesto 4

La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón  
 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4, en dos  
 experimentos independientes, fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con  
 valores de Cl<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar bajo, desde 7,9E-05 hasta 2,65E-03 µg/ml (de 1,2E-10 a 4,0E-09 M),  
 25 siendo el valor medio de Cl<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 8,4E-04 µg/ml (equivalente a 1,2E-09 M). Por  
 tanto, la citotoxicidad del compuesto 4 fue más bien independiente del estado de CD13 de las líneas de células  
 tumorales (tabla 34).

Tabla 34. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	7,93E-05	2,78E-04	2,65E-03	3,58E-04
Cl <sub>50</sub> (Molar)	1,20E-10	4,19E-10	4,00E-09	5,39E-10

#### Citotoxicidad del compuesto 12

30 La actividad del compuesto 12 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5)  
 desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 7,9E-07 a 2,0E-10 M). La actividad citotóxica del compuesto 12, en dos  
 experimentos independientes, fue algo homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con  
 valores de Cl<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 4,4E-03 hasta 4,8E-02 µg/ml (de 3,5E-09 a 3,8E-08 M), siendo el  
 valor medio de Cl<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 2,0E-02 µg/ml (1,6E-08 M). La presencia del largo  
 35 grupo de unión en el compuesto 12 disminuyó (aprox. 1 log) la actividad citotóxica del compuesto, en comparación  
 con el compuesto 4. Además, la citotoxicidad del compuesto no estaba relacionada con el estado de CD13 de las

líneas de células tumorales (tabla 35).

Tabla 34. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 12

	Compuesto 12			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	4,45E-03	1,07E-02	4,80E-02	1,90E-02
Cl <sub>50</sub> (Molar)	3,53E-09	8,44E-09	3,80E-08	1,51E-08

**Citotoxicidad de ADC10**

5 La actividad citotóxica del ADC10 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración máxima 1 µg/ml) en la figura 21.

10 El conjugado ADC10 mostró una especificidad significativa contra células que expresan CD13+, en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica similar, o ligeramente superior a la de los compuestos originales 4 y 12. Ambas líneas celulares CD13+, NB4 y U937, mostraron una sensibilidad comparable contra ADC10, con valores medios de Cl<sub>50</sub> de 7,2E-03 y 9,8E-03 µg/ml, respectivamente. Las dos líneas celulares negativas para CD13, Raji y RPMI-8226, mostraron una sensibilidad significativamente menor contra ADC10, con valores medios de Cl<sub>50</sub> de 1,0E+01 y 5,3E+00 µg/ml, respectivamente. En promedio, las líneas celulares CD13+ (Cl<sub>50</sub> media 8,50E-03 µg/ml) fueron alrededor de 900 veces más reactivas a ADC10 que las células CD13- (Cl<sub>50</sub> media 7,83E+00 µg/ml). Al  
15 comparar la actividad de ADC10 en células NB4 (las más sensibles) frente a células Raji (las menos sensibles); se encontró una diferencia de alrededor de 1440 veces. Estos resultados mostraron claramente la especificidad de ADC10 contra células que expresan CD13 (tabla 36). Se supone, por tanto, que el ADC10 estaba, al menos en parte, actuando a través de la interacción del AcM con el receptor CD13 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

20 Tabla 36. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC10

	ADC10			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	7,18E-03	9,81E-03	1,04E+01	5,30E+00
Cl <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD13				8,50E-03
Cl <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD13				7,83E+00

25 Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM solo con la del conjugado ADC10, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o el ADC a 50 ó 1 µg/ml en la figura 22. A una concentración igual de 50 µg/ml, el anticuerpo anti-CD13 solo no mostró actividad citotóxica contra ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD13. En cambio, el conjugado ADC10 mostró una potente actividad citotóxica contra todas las líneas celulares, induciendo una inhibición de la supervivencia celular de más del 80%, excepto para células Raji, en las que produjo una inhibición menor, pero aun así importante de alrededor del 70%. A una concentración de 1 µg/ml, ADC10 mostró una actividad citotóxica similar contra las células positivas para CD13 que la observada a 50 µg/ml, pero sin ningún efecto detectable sobre células negativas para CD13. Estos resultados  
30 demostraron además la notable actividad citotóxica y especificidad de ADC10 contra células tumorales humanas que expresan CD13 *in vitro*.

Ejemplo de bioactividad 11 - Citotoxicidad de ADC11 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD13

35 Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC11 junto con los compuestos citotóxicos originales 13 y 40, contra diferentes líneas de células tumorales humanas que expresan o no el receptor CD13, incluyendo NB4 y U937 (células positivas para CD13) y Raji y RPMI-8226 (células negativas para CD13). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad del compuesto 40*

La actividad citotóxica del compuesto 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40, en dos experimentos independientes, fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo picomolar bajo, desde 3,1E-05 hasta 1,7E-04 µg/ml (de 5,2E-11 a 2,8E-10 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 8,6E-05 µg/ml (equivalente a 1,4E-10 M). La citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente de los niveles de expresión de CD13 en las líneas de células tumorales (tabla 37).

Tabla 37. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
$Cl_{50}$ (µg/ml)	3,15E-05	7,10E-05	1,70E-04	7,05E-05
$Cl_{50}$ (Molar)	5,20E-11	1,17E-10	2,80E-10	1,16E-10

10 *Citotoxicidad del compuesto 13*

La actividad del compuesto 13 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,3E-07 a 3,4E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 13, en dos experimentos independientes, fue algo homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 1,7E-03 hasta 1,0E-02 µg/ml (de 2,7E-09 a 1,4E-08 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 4,3E-03 µg/ml (5,7E-09 M). La presencia de la cola que contiene tiol en el compuesto 13 redujo (menos de 1 log) la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40. La citotoxicidad del compuesto fue más bien independiente del estado de CD13 de las líneas de células tumorales (tabla 38).

Tabla 38. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 13

	Compuesto 13			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
$Cl_{50}$ (µg/ml)	1,70E-03	2,85E-03	1,03E-02	2,30E-03
$Cl_{50}$ (Molar)	2,26E-09	3,80E-09	1,37E-08	3,06E-09

20 *Citotoxicidad de ADC11*

La actividad citotóxica del ADC11 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas celulares. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, en dos experimentos independientes. Se muestra una curva de DR representativa (concentración máxima de 1 µg/ml) en la figura 23. ADC11 mostró alguna, pero poca, especificidad contra las células que expresan CD13. El conjugado tuvo una actividad citotóxica más bien similar, excepto para células Raji, que son ligeramente menos sensibles, en todas las líneas celulares sometidas a prueba. La actividad de ADC11 fue comparable con la del compuesto original 13, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar bajo (tabla 39).

Tabla 39. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC11

	ADC11			
	Líneas celulares			
	CD13+		CD13-	
	NB-4	U937	Raji	RPMI18226
$Cl_{50}$ (µg/ml)	2,27E-01	6,77E-01	3,48E+00	6,95E-01

CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD13	4,52E-01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD13	2,09E+00

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM anti-CD13 solo con la del conjugado ADC11, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o el ADC11 (50 ó 1 µg/ml) en la figura 24. A una concentración de 50 µg/ml, el anticuerpo anti-CD13 solo, mostró alguna actividad citotóxica contra líneas celulares CD13+, produciendo una inhibición de la supervivencia celular de alrededor del 30%. En células CD13-, el anticuerpo fue prácticamente inactivo. A la misma concentración, el conjugado ADC11 mostró una potente actividad citotóxica contra todas las líneas celulares, con alguna, pero muy poca, especificidad contra células que expresan CD13, en las que indujo una reducción de supervivencia celular de casi el 100%. En células CD13-, ADC11 indujo una reducción de más del 80% en la supervivencia celular. A una concentración de 1 µg/ml, ADC11 mostró más especificidad contra células CD13+, NB-4 y U937, en las que indujo una reducción de supervivencia celular del 99 y el 85%, respectivamente. En células CD13-, Raji y RPMI8226, el conjugado indujo una reducción de supervivencia celular del 38 y el 60%, respectivamente.

Ejemplo de bioactividad 12 - Citotoxicidad de ADC12 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD20

Se evaluó se sometió a ensayo la actividad citotóxica *in vitro* de ADC12 junto con los compuestos citotóxicos originales 1, 4 y 40, contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD20, incluyendo Raji (células positivas para CD20); RPMI-8226 y Karpas-299 (células negativas para CD20). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad de rituximab*

En primer lugar, la actividad citotóxica *in vitro* del AcM solo rituximab se sometió a ensayo contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD20, incluyendo Raji (células positivas para CD20); RPMI-8226 y Karpas-299 (células negativas para CD20). En curvas de DR por triplicado que abarcan desde 5,0E+01 hasta 2,62E-05 µg/ml (de 3,4E-07 a 1,7E-13 M), el anticuerpo fue más bien inactivo, no alcanzando la CI<sub>50</sub> en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD20 (tabla 40).

Tabla 40. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de rituximab

	Rituximab		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
CI <sub>50</sub> (Molar)	>3,48E-07	>3,48E-07	>3,48E-07

*Citotoxicidad del compuesto 40*

La actividad citotóxica del compuesto original, compuesto 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo subnanomolar bajo, desde 8,6E-05 hasta 1,1E-04 µg/ml (de 1,4E-10 a 1,9E-10 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 9,6E-05 µg/ml (equivalente a 1,6E-10 M). La citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 41).

Tabla 41. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,15E-04	8,65E-05	8,60E-05
CI <sub>50</sub> (Molar)	1,90E-10	1,43E-10	1,42E-10

*Citotoxicidad del compuesto 4*

La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 5,7E-04 hasta 1,4E-03 µg/ml (de 8,6E-10 a 2,1E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 9,7E-04 µg/ml (1,5E-09 M). La presencia del grupo que contiene amina en el compuesto 4 redujo ligeramente la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40. La actividad citotóxica del compuesto 4 también fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 42).

Tabla 42. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,41E-03	5,70E-04	9,30E-04
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,12E-09	8,59E-10	1,40E-09

10 **Citotoxicidad del compuesto 1**

La actividad del compuesto 1 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,2E-07 a 3,0E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 1, en dos experimentos independientes, fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 1,6E-03 hasta 2,8E-03 µg/ml (de 1,9E-09 a 3,3E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 2,1E-03 µg/ml (2,5E-09 M). La presencia del grupo de unión de maleimida en el compuesto 1 no altera significativamente la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 4. Además, la citotoxicidad del compuesto también fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 43).

Tabla 43. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	2,85E-03	1,60E-03	1,90E-03
CI <sub>50</sub> (Molar)	3,33E-09	1,87E-09	2,22E-09

20 **Citotoxicidad de ADC12**

La actividad citotóxica del ADC12 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 25. Aunque fue mayor en células Raji positivas para CD20, ADC12 presentó una actividad citotóxica relativamente similar, en el intervalo nanomolar, en todas las líneas celulares sometidas a prueba. Las células Raji (CD20+), mostraron un valor medio de CI<sub>50</sub> de 9,5E-02 µg/ml, mientras que los valores respectivos para células RPMI-8226 y Karpas-299 (ambas CD20-), fueron de 4,0E-01 y 4,1E-01 µg/ml, respectivamente (tabla 44). Por tanto, las células positivas para CD20 fueron ligeramente más sensibles (4 veces) a ADC12 que células negativas para CD20.

30 Tabla 44. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC12

	ADC12		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	9,54E-02	3,97E-01	4,13E-01



CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD20	9,54E-02
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD20	4,05E-01

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM rituximab solo con la del conjugado ADC12, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC12 (1 y 0,1 µg/ml) en la figura 26. El rituximab solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue prácticamente inactivo en todas las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD20. En cambio, el ADC12, a una concentración de 1 µg/ml, mostró una potente actividad citotóxica en todas las líneas celulares sometidas a prueba, provocando una reducción de más del 70% en la supervivencia celular después de 72 horas de tratamiento. A una concentración menor, 0,1 µg/ml, el conjugado ADC12 mostró alguna especificidad, induciendo una reducción de supervivencia celular de alrededor del 60% en células positivas para CD20 (Raji), mientras que fue prácticamente inactivo en células negativas para CD20 (RPMI-8226 y Karpas-299).

Ejemplo de bioactividad 13 - Citotoxicidad de ADC13 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD20

Se evaluó se sometió a ensayo la actividad citotóxica *in vitro* de ADC13 junto con los compuestos citotóxicos originales 1, 4 y 40, contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD20, incluyendo Raji (células positivas para CD20); RPMI-8226 y Karpas-299 (células negativas para CD20). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad del compuesto 40*

La actividad citotóxica del compuesto original, compuesto 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo subnanomolar bajo, desde 8,6E-05 hasta 1,1E-04 mg/ml (de 1,4E-10 a 1,9E-10 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 9,6E-05 µg/ml (equivalente a 1,6E-10 M). La citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 45).

Tabla 45. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,15E-04	8,65E-05	8,60E-05
CI <sub>50</sub> (Molar)	1,90E-10	1,43E-10	1,42E-10

*Citotoxicidad del compuesto 4*

La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 5,7E-04 hasta 1,4E-03 µg/ml (de 8,6E-10 a 2,1E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 9,7E-04 µg/ml (1,5E-09 M). La presencia del grupo que contiene amina en el compuesto 4 redujo ligeramente la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40. La actividad citotóxica del compuesto 4 también fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 46).

Tabla 46. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,41E-03	5,70E-04	9,30E-04
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,12E-09	8,59E-10	1,40E-09

*Citotoxicidad del compuesto 12*

La actividad del compuesto 12 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 7,9E-07 a 2,1E-10 M). La actividad citotóxica del compuesto 12, en dos experimentos independientes, fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 2,2E-02 hasta 6,7E-02 µg/ml (de 1,8E-08 a 5,5E-08 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 3,9E-02 µg/ml (3,1E-08 M). La presencia del grupo de unión de maleimida en el compuesto 12 redujo la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 4 y el compuesto 40. Además, la citotoxicidad del compuesto también fue independiente del estado de CD20 de las líneas de células tumorales (tabla 47).

10 Tabla 47. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 12

	Compuesto 12		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	6,95E-02	2,25E-02	2,50E-02
CI <sub>50</sub> (Molar)	5,51E-08	1,78E-08	1,98E-08

*Citotoxicidad de ADC13*

La actividad citotóxica del ADC13 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 27. Aunque fue mayor en células Raji positivas para CD20, ADC13 presentó una actividad citotóxica más bien similar, en el intervalo nanomolar, en todas las líneas celulares sometidas a prueba. Las células Raji (CD20+), mostraron un valor medio de CI<sub>50</sub> de 2,5E-01 µg/ml, mientras que los valores respectivos para células RPMI-8226 y Karpas-299 (ambas CD20-), fueron de 1,1E+00 µg/ml (tabla 48). Por tanto, las células positivas para CD20 fueron ligeramente más sensibles (aproximadamente 5 veces) a ADC13 que las células negativas para CD20.

20 Tabla 48. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC13

	ADC13		
	CD20+	CD20-	
	Raji	RPMI-8226	Karpas-299
	Linfoma de Burkitt	Mieloma múltiple	NHL
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	2,53E-01	1,08E+00	1,07E+00
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD20			2,53E-01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD20			1,07E+00

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM rituximab solo con la del conjugado ADC13, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC13 (1 y 0,1 µg/ml) en la figura 28. El rituximab solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue prácticamente inactivo en todas las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD20. En cambio, ADC13 mostró, tanto a 1 como a 0,1 µg/ml, actividad citotóxica, con algo de especificidad para células Raji que expresan CD20. A 1 µg/ml, ADC13 provocó, después de 72 horas de tratamiento, una reducción de más del 65% en la supervivencia celular de células Raji (CD20+) mientras que indujo un 35-45% en células RPMI-8226 y Karpas-299 (CD20-), respectivamente. A 0,1 µg/ml, el conjugado ADC13 mostró una especificidad más clara, induciendo una reducción de supervivencia celular de alrededor del 50% en células CD20+, mientras que fue inactivo en células CD20-.

Ejemplo de bioactividad 14 - Citotoxicidad de ADC14 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD5

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC14 junto con los compuestos citotóxicos originales 1, 4 y 40, contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD5, incluyendo Karpas-299 y MOLT-4 (ambas CD5+); Raji y RPMI-8226 (ambas CD5-). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad de AcM anti-CD5*

En primer lugar, la actividad citotóxica *in vitro* del AcM anti-CD5 de ratón solo se sometió a ensayo contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD5, incluyendo Karpas-299 y MOLT-4 (ambas CD5+); Raji y RPMI- 8226 (ambas CD5-). En curvas de DR por triplicado que abarcan desde 5,0E+01 hasta 1,3E-02  $\mu\text{g/ml}$  (de 3,3E-07 a 8,7E-11 M), en dos experimentos independientes, el anticuerpo fue prácticamente inactivo, no alcanzando la  $\text{Cl}_{50}$  en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD5 (tabla 49).

Tabla 49. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de AcM anti-CD5

	AcM anti-CD5			
	Líneas celulares			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI18226
$\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
$\text{Cl}_{50}$ (Molar)	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07

*Citotoxicidad del compuesto 40*

La actividad citotóxica del compuesto original 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue muy homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $\text{Cl}_{50}$  en el intervalo subnanomolar bajo, desde 7,5E-05 hasta 3,6E-04  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,2E-10 a 5,9E-10 M), siendo el valor medio de  $\text{Cl}_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,6E-04  $\mu\text{g/ml}$  (equivalente a 2,6E-10 M). La citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (tabla 50).

Tabla 50. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40			
	Líneas celulares			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI18226
$\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,12E-04	9,34E-05	3,60E-04	7,55E-05
$\text{Cl}_{50}$ (Molar)	1,85E-10	1,54E-10	5,94E-10	1,25E-10

*Citotoxicidad del compuesto 4*

La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $\text{Cl}_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 6,3E-04 hasta 2,7E-03  $\mu\text{g/ml}$  (de 9,5E-10 a 4,1E-09 M), siendo el valor medio de  $\text{Cl}_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,3E-03  $\mu\text{g/ml}$  (1,9E-09 M). La presencia del grupo que contiene amina en el compuesto 4 redujo la actividad citotóxica del compuesto (alrededor de 1 log), en comparación con el compuesto 40. La actividad citotóxica del compuesto 4 fue también independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (tabla 51).

Tabla 51. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Líneas celulares			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI18226
$\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	9,15E-04	9,10E-04	2,70E-03	6,30E-03
$\text{Cl}_{50}$ (Molar)	1,38E-09	1,37E-09	4,07E-09	9,50E-10

*Citotoxicidad del compuesto 1*

La actividad del compuesto 1 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,2E-07 a 3,0E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 1 fue casi homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, excepto para células Raji en las que el compuesto fue menos activo, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 1,8E-03 hasta 1,1E-02 µg/ml (de 2,2E-09 a 1,3E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa 4,6E-03 µg/ml (5,3E-09 M). La presencia del grupo de unión que contiene maleimida en el compuesto 1 no alteró la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 4. La citotoxicidad del compuesto fue también independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (tabla 52).

Tabla 52. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1			
	Líneas celulares			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI18226
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	2,15E-03	3,35E-03	1,09E-02	1,85E-03
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,51E-09	3,91E-09	1,28E-08	2,16E-09

10 **Citotoxicidad de ADC14**

La actividad citotóxica del ADC14 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 29. ADC14 mostró alguna tendencia de selectividad contra células positivas para CD5, aunque los valores medios de CI<sub>50</sub>, en el intervalo nanomolar medio, fueron relativamente similares para todas las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente del estado de CD5 (tabla 53).

Tabla 53. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC14

	ADC14			
	Líneas celulares			
	CD5+		CD5-	
	Karpas-299	MOLT-4	Raji	RPMI18226
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	5,56E-01	6,18E-01	4,23E+00	5,47E+00
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células positivas para CD5				5,87E-01
CI <sub>50</sub> media (µg/ml) de células negativas para CD5				2,39E+00

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM anti-CD5 solo con la del conjugado ADC14, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC14 (1 µg/ml) en la figura 30. El AcM anti-CD5 solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue prácticamente inactivo en todas las líneas celulares sometidas a prueba. ADC14, a una concentración de 1 µg/ml, mostró actividad citotóxica específica contra las células positivas para CD5, Karpas-299 y MOLT-4, induciendo una inhibición en supervivencia celular de alrededor del 84% y el 70%, respectivamente, mientras que fue prácticamente inactivo contra células negativas para CD5 (figura 30).

Ejemplo de bioactividad 15 - Citotoxicidad de ADC16 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD4

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC16 junto con los compuestos citotóxicos originales 1, 4 y 40, contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD4, incluyendo Karpas-299 y U937 (ambas CD4+); Raji y RPMI-8226 (ambas CD4-). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

**Citotoxicidad del AcM anti-CD4**

En primer lugar, la actividad citotóxica *in vitro* del AcM anti-CD4 de ratón solo se sometió a ensayo contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD4, incluyendo Karpas-299 y U937 (ambas CD4+); Raji y RPMI-8226 (ambas CD4-). En curvas de DR por triplicado que abarcan desde 5,0E+01 hasta 1,3E-02 µg/ml (de 3,3E-07 a 8,7E-11 M), en dos experimentos independientes, el anticuerpo fue prácticamente

inactivo, no alcanzando la  $Cl_{50}$  en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD4 (tabla 54).

Tabla 54. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del AcM anti-CD4

	AcM anti-CD4			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
$Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01	>5,0E+01
$Cl_{50}$ (Molar)	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07	>3,3E-07

#### Citotoxicidad del compuesto 40

- 5 La actividad citotóxica del compuesto original, compuesto 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo subnanomolar bajo, desde 7,9E-05 hasta 2,8E-04  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,3E-10 a 4,7E-10 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,5E-04  $\mu\text{g/ml}$  (equivalente a 2,5E-10 M). La citotoxicidad del  
10 compuesto 40 fue independiente de los niveles de expresión de CD4 en las líneas de células tumorales (tabla 55).

Tabla 55. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
$Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1,30E-04	7,90E-05	1,20E-04	2,85E-04
$Cl_{50}$ (Molar)	2,15E-10	1,31E-10	1,98E-10	4,70E-10

#### Citotoxicidad del compuesto 4

- 15 La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue también homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 6,1E-04 hasta 2,7E-03  $\mu\text{g/ml}$  (de 9,2E-10 a 4,1E-09 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 1,2E-03  $\mu\text{g/ml}$  (1,8E-09 M). La presencia del grupo que contiene amina en el compuesto 4 redujo la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40. La actividad citotóxica del compuesto 4 fue también independiente de los niveles de expresión de CD4 en las líneas de células tumorales (tabla 56).  
20

Tabla 56. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
$Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	9,10E-04	6,10E-04	6,35E-04	2,75E-03
$Cl_{50}$ (Molar)	1,38E-09	9,20E-10	9,60E-10	4,15E-09

#### Citotoxicidad del compuesto 1

- 25 La actividad del compuesto 1 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,2E-07 a 3,0E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 1 fue también homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo nanomolar, desde 1,5E-03 hasta 7,3E-03  $\mu\text{g/ml}$  (de 1,7E-09 a 8,6E-09 M), siendo el valor medio de  $Cl_{50}$  en todo el panel de la célula completa de 3,4E-03  $\mu\text{g/ml}$  (3,9E-09 M). La presencia del grupo de unión que contiene maleimida

en el compuesto 1 no alteró la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 4. La citotoxicidad del compuesto fue también independiente de los niveles de expresión de CD4 en las líneas de células tumorales (tabla 57).

Tabla 57. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	2,35E-03	1,50E-03	2,30E-03	7,35E-03
Cl <sub>50</sub> (Molar)	2,75E-09	1,75E-09	2,69E-09	8,57E-09

5 **Citotoxicidad de ADC16**

La actividad citotóxica del ADC16 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. El conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 31. ADC16 presentó algo de especificidad contra células positivas para CD4, aunque la diferencia media en la sensibilidad con respecto a las células negativas para CD4 fue relativamente baja, aproximadamente 7 veces (siendo la diferencia máxima entre la línea celular menos y más sensible, Raji y Karpas-299, respectivamente, fue de alrededor de 14 veces) (tabla 58). Aunque muestra una pequeña ventana terapéutica, fue probable que, al menos parte de la citotoxicidad de ADC16 observada se mediara por la interacción del AcM y la glicoproteína CD4 en la membrana celular de células tumorales.

Tabla 58. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC16

	ADC16			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	4,70E-02	8,18E-02	2,60E-01	6,74E-01
Cl <sub>50</sub> (µg/ml) de células positivas para CD4				6,44E-02
Cl <sub>50</sub> (µg/ml) de células negativas para CD4				4,67E-01

Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM anti-CD4 solo con la del conjugado ADC16, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC16 (1 y 0,1 µg/ml) en la figura 32. El AcM anti-CD4 solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue prácticamente inactivo en todas las líneas celulares sometidas a prueba. En cambio, ADC16, a una concentración de 1 µg/ml, mostró una potente actividad citotóxica en todas las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD4, provocando una reducción de más del 60% (intervalo del 60-90%) en la supervivencia celular después de 72 horas de tratamiento. Incluso a una concentración de 0,1 µg/ml, ADC16 mostró actividad citotóxica específica contra las células positivas para CD4, Karpas-299 y U937, induciendo una inhibición en supervivencia celular de alrededor del 80% y el 70%, respectivamente, mientras que fue inactivo contra células negativas para CD4 (figura 32).

Ejemplo de bioactividad 16 - Citotoxicidad de ADC17 y reactivos relacionados contra células tumorales humanas positivas y negativas para CD4

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC17 junto con los compuestos citotóxicos originales 12, 4 y 40, contra diferentes líneas celulares de cáncer humano que expresan o no el antígeno CD4, incluyendo Karpas-299 y U937 (ambas CD4+); Raji y RPMI-8226 (ambas CD4-). Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

**Citotoxicidad del compuesto 40**

La actividad citotóxica del compuesto original 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de Cl<sub>50</sub> en el

intervalo subnanomolar bajo, desde 7,9E-05 hasta 2,8E-04 µg/ml (de 1,3E-10 a 4,7E-10 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,5E-04 µg/ml (equivalente a 2,5E-10 M). La citotoxicidad del compuesto 40 fue independiente de los niveles de expresión de CD4 en las líneas de células tumorales (tabla 59).

Tabla 59. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	1,30E-04	7,90E-05	1,20E-04	2,85E-04
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,15E-10	1,31E-10	1,98E-10	4,70E-10

5 *Citotoxicidad del compuesto 4*

La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue también homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 6,1E-04 hasta 2,7E-03 µg/ml (de 9,2E-10 a 4,1E-09 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,2E-03 µg/ml (1,8E-09 M). La presencia del grupo que contiene amina en el compuesto 4 redujo la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40. La actividad citotóxica del compuesto 4 fue también independiente de los niveles de expresión de CD4 en las líneas de células tumorales (tabla 60).

Tabla 60. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	9,10E-04	6,10E-04	6,35E-04	2,75E-03
CI <sub>50</sub> (Molar)	1,38E-09	9,20E-10	9,60E-10	4,15E-09

15 *Citotoxicidad del compuesto 12*

La actividad del compuesto 12 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E+00 hasta 2,6E-04 µg/ml (de 7,9E-07 a 2,1E-10 M). La actividad citotóxica del compuesto 12, en dos experimentos independientes, fue relativamente homogénea en todas las diferentes líneas celulares sometidas a prueba, con valores de CI<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar, desde 7,3E-02 hasta 4,1E-01 µg/ml (de 5,8E-08 a 3,2E-07 M), siendo el valor medio de CI<sub>50</sub> en todo el panel de la célula completa de 1,7E-01 µg/ml (1,3E-07 M). La presencia del grupo de unión que contiene maleimida largo en el compuesto 12 redujo fuertemente la actividad citotóxica del compuesto, en comparación con el compuesto 40 (casi 3 log) y el compuesto 4 (casi 2 log). Además, la citotoxicidad del compuesto fue también independiente de los niveles de expresión de CD4 de las líneas de células tumorales (tabla 61).

25 Tabla 61. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 12

	Compuesto 12			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	7,65E-02	7,30E-02	1,15E-01	4,15E-01
CI <sub>50</sub> (Molar)	6,07E-08	5,79E-08	9,11E-08	3,29E-07

*Citotoxicidad de ADC17*

La actividad citotóxica del ADC17 se sometió a ensayo contra las diferentes líneas de células tumorales. El

5 conjugado se sometió a ensayo en cuatro intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 50, 10, 1 y 0,1 µg/ml, respectivamente. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 1 µg/ml) en la figura 33. ADC17 presentó especificidad contra células positivas para CD4, con una diferencia media en la sensibilidad con respecto a las células negativas para CD4 de alrededor de 40 veces (intervalo entre 11-64 veces) (tabla 62). Fue probable que una parte principal de la actividad citotóxica de ADC17 observada se mediara por la interacción del AcM y la glicoproteína CD4 en la membrana celular de células tumorales.

Tabla 62. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC17

	ADC17			
	Líneas celulares			
	CD4+		CD4-	
	Karpas-299	U937	RPMI18226	Raji
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	4,50E-02	3,86E-02	5,24E-01	2,90E+00
Cl <sub>50</sub> (µg/ml) de células positivas para CD4				4,18E-02
Cl <sub>50</sub> (µg/ml) de células negativas para CD4				1,71E+00

10 Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM anti-CD4 solo con la del conjugado ADC17, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC17 (1 y 0,1 µg/ml) en la figura 34. AcM anti-CD4 solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue prácticamente inactivo en todas las líneas celulares sometidas a prueba. En cambio, ADC17, a una concentración de 1 µg/ml, mostró una potente actividad citotóxica en tres de las cuatro líneas celulares sometidas a prueba (excepto células Raji), provocando una reducción de más del 70% (intervalo del 72 - 15 95%) en la supervivencia celular después de 72 horas de tratamiento. Incluso a una concentración de 0,1 µg/ml, ADC17 mostró actividad citotóxica específica contra las células positivas para CD4, Karpas-299 y U937, induciendo una inhibición en supervivencia celular de alrededor del 70% y el 75%, respectivamente, mientras que fue bastante inactivo contra células negativas para CD4 (figura 34).

20 Ejemplo de bioactividad 17 - Citotoxicidad de ADC14 y reactivos relacionados contra clones de células Raji con expresión de CD5 alta o nula

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC14 junto con los compuestos citotóxicos originales 1, 4 y 40, contra clones de células Raji que expresan o no el antígeno CD5. Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad del AcM anti-CD5*

25 La actividad citotóxica *in vitro* del AcM anti-CD5 de ratón solo se sometió a ensayo contra clones de células Raji que expresan (C#10) o no (C#18) el antígeno CD5. En curvas de DR por triplicado que oscilan entre 5,0E+01 y 1,3E-02 µg/ml (3,3E-07 - 8,7E- 11 M), en dos experimentos independientes, el anticuerpo fue prácticamente inactivo, no alcanzando la Cl<sub>50</sub> en ninguna de las líneas celulares sometidas a prueba, independientemente de su estado de CD5 (tabla 63).

30 Tabla 63. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de AcM anti-CD5

	AcM anti-CD5	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	>5,0E+01	>5,0E+01
Cl <sub>50</sub> (Molar)	>3,3E-07	>3,3E-07

*Citotoxicidad del compuesto 40*

35 La actividad citotóxica del compuesto original 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue relativamente similar entre las células Raji que expresan CD5 (clon n.º 10) y que no lo expresan (clon n.º 18), con valores medios de Cl<sub>50</sub> en el intervalo subnanomolar, 4,95E-04 y 8,90E-04 µg/ml (equivalente a 8,17E-10 y 1,47E-09 M), respectivamente. Aunque es ligeramente mayor en células positivas para CD5, la citotoxicidad del compuesto 40 parecía ser más bien independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas



de células tumorales (tabla 64)

Tabla 64. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	4,95E-04	8,90E-04
Cl <sub>50</sub> (Molar)	8,17E-10	1,47E-09

#### Citotoxicidad del compuesto 4

5 La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de respuesta DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue relativamente similar entre las células Raji que expresan CD5 (clon n.º 10) y que no lo expresan (clon n.º 18), aunque en las células nulas el compuesto no alcanzó el valor de Cl<sub>50</sub>. En las células positivas para CD5, el compuesto mostró un valor medio de Cl<sub>50</sub> de 9,9E-03 µg/ml (equivalente a 1,57E-08 M). Aunque es ligeramente mayor en células positivas para CD5, la citotoxicidad del compuesto 4 parecía ser más bien independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (véanse los valores de Cl<sub>20</sub> en la tabla 65 como referencia).

Tabla 65. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
Cl <sub>20</sub> (µg/ml)	4,65E-03	6,77E-03
Cl <sub>20</sub> (Molar)	7,01E-09	1,02E-08
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	9,90E-03	>1,00E-02
Cl <sub>50</sub> (Molar)	1,49E-08	>1,51 E-08

#### Citotoxicidad del compuesto 1

15 La actividad del compuesto 1 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-01 hasta 2,6E-05 µg/ml (de 1,2E-07 a 3,0E-11 M). La actividad citotóxica del compuesto 1 difiere entre los dos clones de células Raji, siendo más activo (alrededor de 1 log) en células que sobreexpresan CD5 (clon n.º 10) que en células nulas para CD5 (clon n.º 18), con valores medios de Cl<sub>50</sub> de 2,9E-03 y 3,8E-02 µg/ml (equivalente a 3,4E-09 y 4,4E-08 M), respectivamente (tabla 66). En este caso la citotoxicidad del compuesto 1 parecía no ser independiente del estado de CD5 de las líneas de células tumorales.

20 Tabla 66. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 1

	Compuesto 1	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	2,90E-03	3,80E-02
Cl <sub>50</sub> (Molar)	3,39E-09	4,44E-08

#### Citotoxicidad de ADC14

25 La actividad citotóxica del ADC14 se sometió a ensayo contra los dos clones de Raji. El conjugado se sometió a ensayo en tres intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 10, 1 y 0,1 µg/ml. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 10 µg/ml) en la figura 35. ADC 14 mostró especificidad contra células que sobreexpresan CD5 (clon n.º 10), en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica similar a, o incluso mayor que, la de los compuestos originales 1, 4 y 40. En células Raji que expresan CD5, el conjugado mostró un valor medio de Cl<sub>50</sub> de

5 1,6E-01 µg/ml. En células nulas para CD5 el conjugado fue más de 50 veces menos activo que en células positivas para CD5, mostrando un valor medio de  $CI_{50}$  de 9,0E+00 µg/ml. Aunque con algunas reservas, debido a algo de sensibilidad diferencial observada entre los dos clones de células Raji contra algunos compuestos originales, estos resultados indicaron que ADC14 tiene especificidad contra células que expresan CD5 (tabla 67). Se supone, por tanto, que ADC14 estaba, al menos parcialmente, actuando a través de la interacción del AcM con el receptor de CD5 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

Tabla 67. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC14

	ADC14	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
$CI_{50}$ (µg/ml)	1,65E-01	9,00E+00

10 Para comparar gráficamente la actividad citotóxica del AcM anti-CD5 solo con la del conjugado ADC14, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC14 (10 µg/ml) en la figura 36. AcM anti-CD5 solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue inactivo contra los dos clones de células Raji, independientemente de su estado de CD5. Por el contrario ADC14, a una concentración de 10 µg/ml, mostró una actividad citotóxica potente y algo selectiva contra células Raji positivas para CD5 (clon n.º 10), provocando una reducción de casi el 90% en su supervivencia celular después de 72 horas de tratamiento. En las mismas condiciones, ADC14 provocó una reducción del 30% en la supervivencia celular de células nulas para CD5 (clon n.º 18) (figura 36).

15 Ejemplo de bioactividad 18 - Citotoxicidad de ADC15 y reactivos relacionados contra clones de células Raji con expresión de CD5 alta o nula

20 Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de ADC15 junto con los compuestos citotóxicos originales 12, 4 y 40, contra clones de células Raji que expresan o no el antígeno CD5. Se realizaron curvas de calibración de respuesta a la dosis (DR) durante 72 horas.

*Citotoxicidad del compuesto 40*

25 La actividad citotóxica del compuesto original 40 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-03 hasta 2,6E-07 µg/ml (de 1,7E-09 a 4,3E-13 M). La actividad citotóxica del compuesto 40 fue relativamente similar entre las células Raji que expresan CD5 (clon n.º 10) y que no lo expresan (clon n.º 18), con valores medios de  $CI_{50}$  en el intervalo subnanomolar, 4,95E-04 y 8,90E-04 µg/ml (equivalente a 8,17E-10 y 1,47E-09 M), respectivamente. Aunque es ligeramente mayor en células positivas para CD5, la citotoxicidad del compuesto 40 parecía ser más bien independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (tabla 68).

30 Tabla 68. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 40

	Compuesto 40	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
$CI_{50}$ (µg/ml)	4,95E-04	8,90E-04
$CI_{50}$ (Molar)	8,17E-10	1,47E-09

*Citotoxicidad del compuesto 4*

35 La actividad citotóxica del compuesto 4 se sometió a ensayo en curvas de respuesta DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E-02 hasta 2,6E-06 µg/ml (de 1,5E-08 a 4,0E-12 M). La actividad citotóxica del compuesto 4 fue relativamente similar entre las células Raji que expresan CD5 (clon n.º 10) y que no lo expresan (clon n.º 18), aunque en las células nulas el compuesto no alcanzó el valor de  $CI_{50}$ . En las células positivas para CD5, el compuesto mostró un valor medio de  $CI_{50}$  de 9,9E-03 µg/ml (equivalente a 1,57E-08 M). Aunque es ligeramente mayor en células positivas para CD5, la citotoxicidad del compuesto 4 parecía ser más bien independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (véanse los valores de  $CI_{20}$  en la tabla 69 como referencia).

40 Tabla 69. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 4

	Compuesto 4	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
CI <sub>20</sub> (µg/ml)	4,65E-03	6,77E-03
CI <sub>20</sub> (Molar)	7,01E-09	1,02E-08
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	9,90E-03	>1,00E-02
CI <sub>50</sub> (Molar)	1,49E-08	>1,51 E-08

#### Citotoxicidad del compuesto 12

La actividad del compuesto 12 se sometió a ensayo en curvas de DR usando diez diluciones en serie (razón 1/2,5) desde 01E+00 hasta 2,6E-4 µg/ml (de 7,9E-07 a 2,1E-10 M). La actividad citotóxica del compuesto 12 fue relativamente similar entre las células Raji que expresan CD5 (clon n.º 10) y las que no lo expresan (clon n.º 18), aunque en las células nulas el compuesto no alcanzó el valor de CI<sub>50</sub>. En las células positivas para CD5, el compuesto mostró un valor medio de CI<sub>50</sub> de 2,7E-01 µg/ml (equivalente a 2,15E-07 M). Aunque es ligeramente mayor en células positivas para CD5, la citotoxicidad del compuesto 12 parecía ser más bien independiente de los niveles de expresión de CD5 en las líneas de células tumorales (véanse los valores de CI<sub>20</sub> en la tabla 70 como referencia).

10 Tabla 70. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto 12

	Compuesto 12	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
CI <sub>20</sub> (µg/ml)	1,50E-01	2,00E-01
CI <sub>20</sub> (Molar)	1,19E-07	1,59E-07
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	2,70E-01	>1,00E+00
CI <sub>50</sub> (Molar)	2,14E-07	>7,92E-07

#### Citotoxicidad de ADC15

La actividad citotóxica del ADC15 se sometió a ensayo contra los dos clones de Raji. El conjugado se sometió a ensayo en tres intervalos diferentes de concentración, cada uno en curvas de DR por triplicado (diez diluciones en serie, razón 1/2,5) partiendo de 10, 1 y 0,1 µg/ml. Se muestra una curva de DR representativa (concentración de partida 10 µg/ml) en la figura 37. ADC15 mostró una especificidad significativa contra células que sobreexpresan CD5 (clon n.º 10), en las que el compuesto demostró una actividad citotóxica similar a la del compuesto original 40 e incluso mayor que la de los compuestos 4 y 12. En células Raji que expresan CD5, el conjugado mostró un valor medio de CI<sub>50</sub> de 9,3E-01 µg/ml. En células nulas para CD5 el conjugado fue mucho más de 10 veces menos activo que en células positivas para CD5, no alcanzando el valor de CI<sub>50</sub>. Aunque con reservas, debido a la sensibilidad potencial observada entre los dos clones de células Raji contra los compuestos originales 4 y 12, estos resultados indican que ADC15 tiene especificidad contra células que expresan CD5 (tabla 71). Puede suponerse que ADC15 estaba, al menos parcialmente, actuando a través de la interacción del AcM con el receptor de CD5 asociado a la membrana en células tumorales, y posterior administración intracelular del fármaco citotóxico en el tejido diana.

20 Tabla 71. Datos de resumen de la citotoxicidad *in vitro* de ADC15

	ADC15	
	Células Raji	
	C#10 (CD5 alta)	C#18 (CD5 nula)
CI <sub>50</sub> (µg/ml)	9,30E-01	>1,0E+01

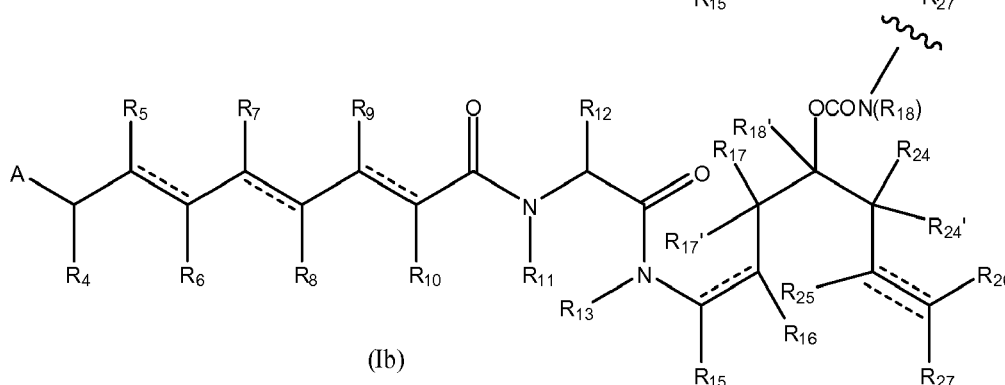
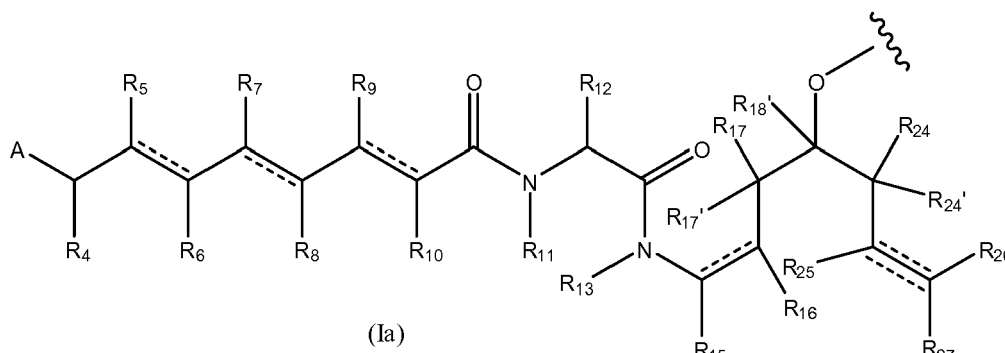
25 Para comparar gráficamente la citotoxicidad actividad del AcM anti-CD5 solo con la del conjugado ADC15, se muestran histogramas que muestran los porcentajes de supervivencia celular después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el AcM solo (50 µg/ml) o ADC15 (10 µg/ml) en la figura 38. AcM anti-CD5 solo, a una concentración de 50 µg/ml, fue inactivo contra los dos clones de células Raji, independientemente de su estado de CD5. Por el contrario, ADC15 a una concentración de 10 µg/ml mostró una actividad citotóxica potente y selectiva

contra células positivas para Raji CD5 (clon n.º 10), provocando una reducción del 80% reducción en su supervivencia celular después de 72 horas de tratamiento. En las mismas condiciones, ADC15 fue inactivo en células nulas para CD5 (clon n.º 18) (figura 38).

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de fármaco que comprende un resto de fármaco unido covalentemente al resto del conjugado de fármaco, teniendo el compuesto la fórmula  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)]_n-Ab$ , en la que D es un resto de fármaco seleccionado de las fórmulas (Ia) y (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo,

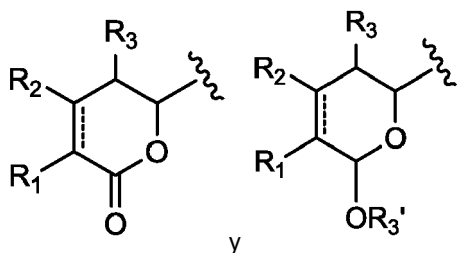
5



en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

10

A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

15

cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se selecciona independientemente de hidrógeno,  $OR_a$ ,  $OCOR_a$ ,  $OCOOR_a$ ,  $NR_aR_b$ ,  $NR_aCOR_b$ ,  $NR_aC(=NR_a)NR_aR_b$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquino  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

20

$R_3'$  se selecciona de hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ ,  $CONR_aR_b$ ,  $S(O)R_a$ ,  $SO_2R_a$ ,  $P(O)(R_a)R_b$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquino  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

cada uno de  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  y  $R_{12}$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquino  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

25

$R_{11}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno,  $COR_a$ ,  $COOR_a$ , alquilo  $C_1-C_{12}$  sustituido o no sustituido, alqueno  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido y alquino  $C_2-C_{12}$  sustituido o no sustituido, o  $R_{11}$  y  $R_{12}$

junto con el átomo de N y átomo de C correspondiente al que se unen pueden formar un grupo heterocíclico, insaturado o saturado, sustituido o no sustituido, de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y opcionalmente que comprende uno o más heteroátomos adicionales seleccionados de átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre en dicho(s) anillo(s) además del átomo de nitrógeno del NR<sub>11</sub>, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>13</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, COR<sub>a</sub>, COOR<sub>a</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido y alqueno C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>18</sub> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y grupos heterocíclicos, insaturados o saturados, sustituidos o no sustituidos, de 5 a 14 miembros que tienen uno o más anillos, en los que sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido y halógeno;

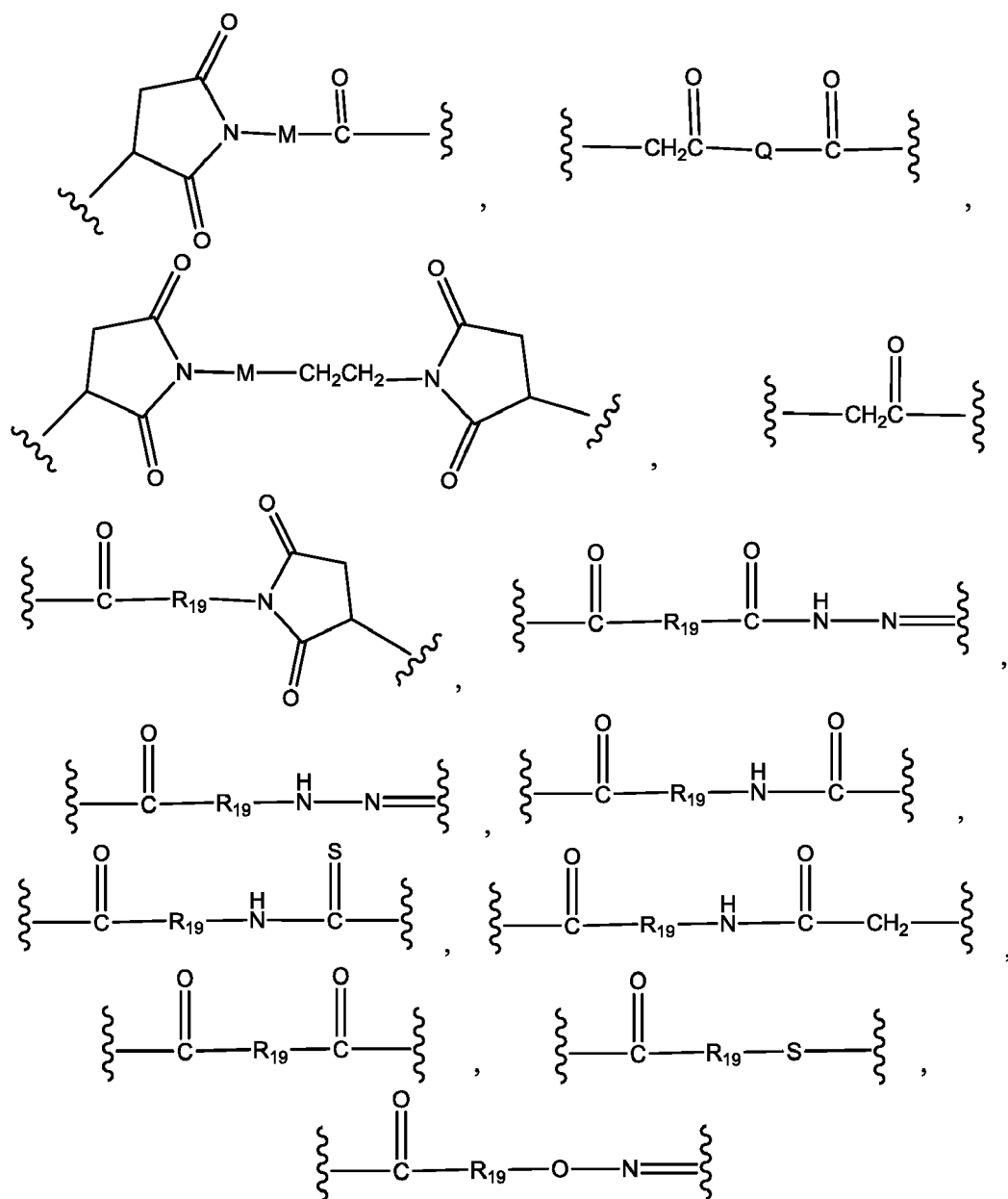
cada uno de R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido o no sustituido, grupos arilo sustituidos o no sustituidos que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos, y grupos heterocíclicos, insaturados o saturados, sustituidos o no sustituidos, de 5 a 14 miembros que tienen uno o más anillos, en los que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, grupos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, grupos alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> que pueden sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>y</sub>, átomos de halógeno, grupos oxo, grupos tio, grupos ciano, grupos nitro, OR<sub>y</sub>, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, S(O)R<sub>y</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, P(O)(R<sub>y</sub>)OR<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>C(=O)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>C(=NR<sub>y</sub>)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes que pueden ser el mismo o diferentes seleccionados del grupo que consiste en R<sub>y</sub>, OR<sub>y</sub>, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>C(=NR<sub>y</sub>)NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, grupos aralquilo que comprenden un grupo alquilo que tiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono sustituidos con un grupo arilo opcionalmente sustituido tal como se definió anteriormente, grupos aralquilo que comprenden un grupo alcoxilo que tiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono sustituidos con un grupo arilo opcionalmente sustituido tal como se definió anteriormente, y un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>y</sub>, y en los que existe más de un sustituyente opcional en cualquier grupo dado, pudiendo ser los sustituyentes opcionales R<sub>y</sub> el mismo o diferentes;

cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituyen con al menos un átomo de halógeno, grupos aralquilo que comprenden un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituye con un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos y grupos heterocicloalquilo que comprenden un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> que se sustituye con un grupo heterocíclico, insaturado o saturado, de 5 a 14 miembros que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s);

y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>;

L es un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en:



5

en las que

10

las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

15

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, en los que cada de uno de los sustituyentes de

25

alquileno anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

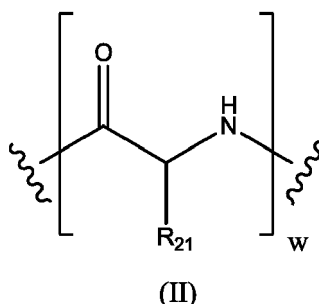
5 M se selecciona del grupo que consiste en -alquileno  $C_1-C_6$ -, -alquileno  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-,  $-(CH_2CH_2O)_s$ -, -alquileno  $C_1-C_6$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ )-CON(H o alquil  $C_1-C_6$ )-alquileno  $C_1-C_6$ -, fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ , fenileno-alquileno  $C_1-C_6$ - en los que el resto de fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$  y -alquileno  $C_1-C_6$ -CON(H o alquil  $C_1-C_6$ )-alquileno  $C_1-C_6$ -;

Q se selecciona del grupo que consiste en -N(H o alquil  $C_1-C_6$ )-fenileno- y -N(H o alquil  $C_1-C_6$ )-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>;

r es un número entero que oscila entre 1 y 10; y

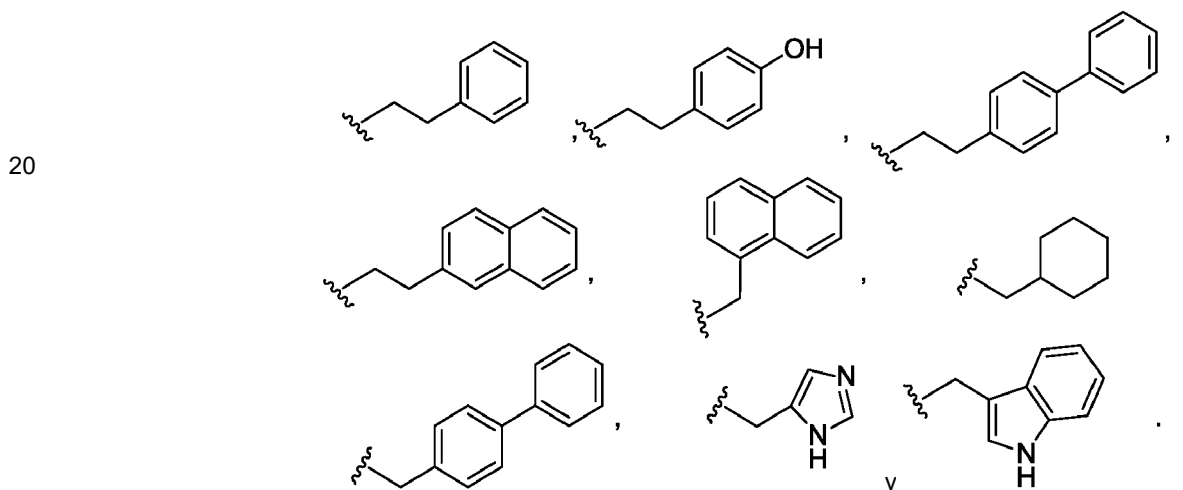
10 s es un número entero que oscila entre 1 y 10;

(AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II):



en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

15  $R_{21}$  se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



y w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en:

25 -CONH-(alquileno  $C_1-C_6$ )-NH-;

-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ )-NH-;

-CONH-(alquileno  $C_1-C_6$ )-NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ )-NH-;

-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ )-NH-;



-COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-;

-COCH<sub>2</sub>NH-;

-CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;

-CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;

5 -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;

-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-;

-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-; y

-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-.

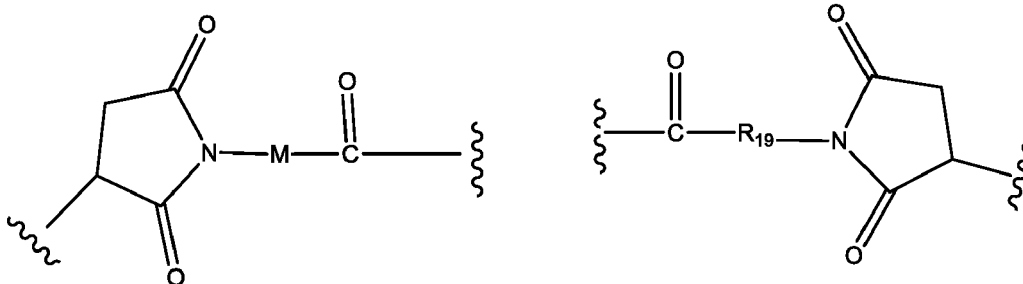
10 b es un número entero de 0 ó 1;

Ab es un resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 20.

2. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, en el que:

15 L es un grupo de unión seleccionado del grupo que consiste en:



y

en los que:

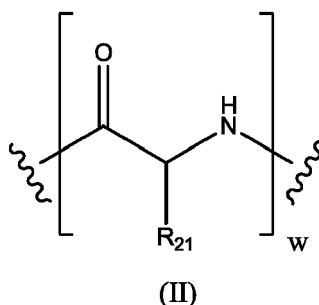
20 las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a un Ab (la línea ondulada a la derecha) y a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda);

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)R- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)R-, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)- y fenileno que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

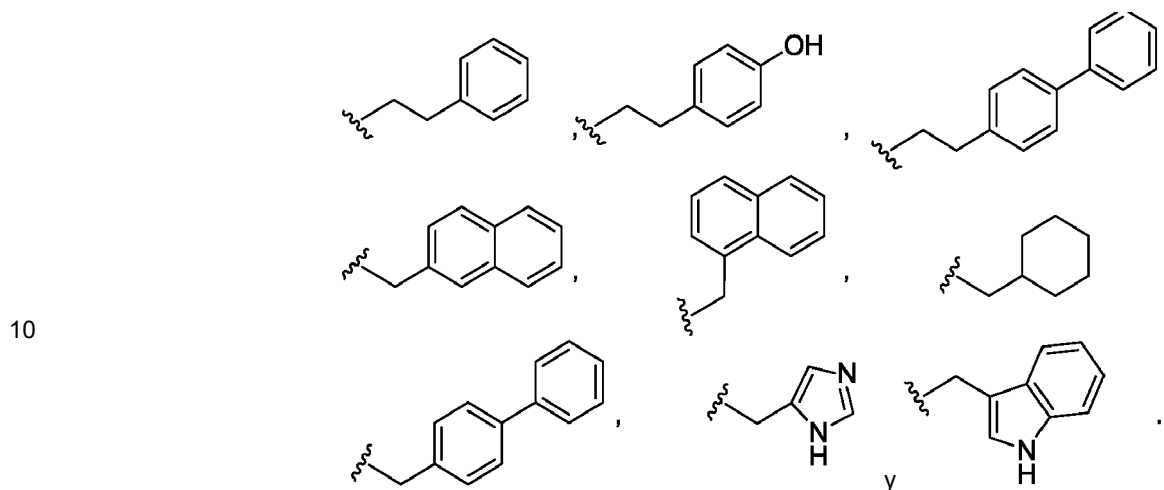
r es un número entero que oscila entre 1-6;

40 (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II):



en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

- 5 R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



w es un número entero que oscila entre 0 y 12;

- 15 en el que X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)S-, -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>)-NH-;

- 20 D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en el que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 25 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>3'</sub> se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub> y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

- 30 R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que

consiste en:

hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub> y NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub>, en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

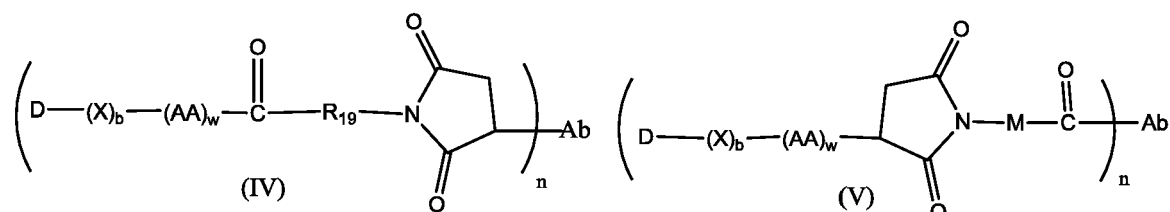
R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub>, un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 12 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, y un grupo heterocíclico insaturado o saturado de 5 a 10 miembros que tiene uno o más anillos, sustituyéndose opcionalmente dicho grupo heterocíclico con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que los sustituyentes R<sub>x</sub> se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, átomos de halógeno, grupos alquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono y grupos dialquilamino que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>; cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>;

el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo glicosilado y un fragmento de unión a antígeno glicosilado; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 1 hasta 12.

3. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

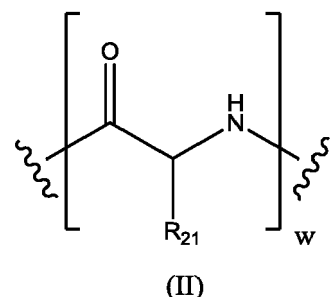


en las que:

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> y -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

M se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>- y -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>-);

(AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II)



en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

$R_{21}$  se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, sec-butilo, bencilo, indolilmetilo,  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ ,  $-(CH_2)_4NH_2$ ,  $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$  y  $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ ;

w es un número entero desde 0 hasta 6;

5 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en  $-CONH-(alquileo\ C_{2-4})NH-$ ,  $-COO-$   
 10  $CH_2$ -fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta  
 15 cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6  
 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno,  
 grupos nitro y grupos ciano,  $-CONH-(alquileo\ C_{2-4})NH-COOCH_2$ -(fenileno que puede sustituirse  
 opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados del grupo que consiste en  
 grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6  
 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-,  $-COCH_2NH-COCH_2-NH-$ ,  $-$   
 $CONH-(alquileo\ C_{2-4})S-$ ,  $-CONH-(alquileo\ C_{2-4})NHCO(alquileo\ C_{1-3})S-$ ,  $-(alquileo\ C_{2-4})NHCO(alquileo\ C_{1-3})S-$ ,  
 $-(alquileo\ C_{2-4})S-$ ,  $-(alquileo\ C_{2-4})NH-$  y  $-(alquileo\ C_{2-4})NH-COO-CH_2-$   
 (fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes  $R_x$  seleccionados  
 del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo  
 que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

$R_1$  es hidrógeno o metoxilo;

20 cada uno de  $R_2$  y  $R_3$  es hidrógeno;

$R_3'$  es hidrógeno;

cada uno de  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$  y  $R_{12}$  se selecciona independientemente de hidrógeno, metilo  
 sustituido y no sustituido, isopropilo sustituido y no sustituido y terc-butilo sustituido y no sustituido, en los  
 que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

25 cada uno de  $R_{11}$  y  $R_{13}$  es hidrógeno;

cada uno de  $R_{15}$ ,  $R_{16}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{17'}$ ,  $R_{18}$ ,  $R_{24}$ ,  $R_{24'}$ ,  $R_{25}$  y  $R_{26}$  se selecciona independientemente del grupo que  
 consiste en:

30 hidrógeno y grupos alquilo  $C_{1-6}$  sustituidos o no sustituidos, en los que los sustituyentes opcionales se  
 seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono,  
 grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno,  $OCOR_y$ ,  $OCOOR_y$ ,  $COR_y$ ,  $COOR_y$ ,  $ONR_yR_z$ ,  
 $CONR_yR_z$ ,  $NR_yR_z$ ,  $NR_yCOR_z$ , en los que cada uno de  $R_y$  y  $R_z$  se selecciona de átomos de hidrógeno y  
 grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono;

$R_{18}$  se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo  $C_{1-6}$  que puede sustituirse opcionalmente con al menos  
 un grupo  $R_x$  y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes  $R_x$ ;

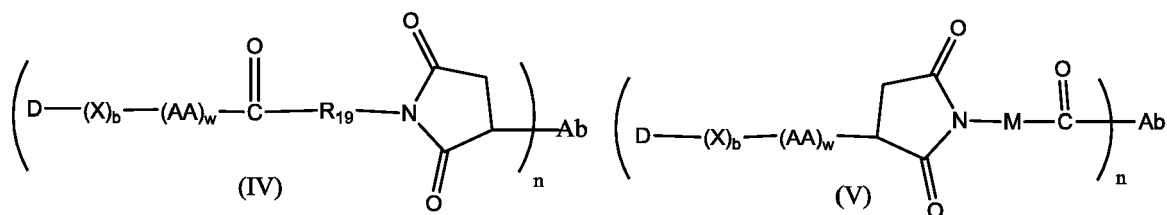
35  $R_{27}$  es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro;

cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el  
 átomo de C al que se une  $R_{25}$  y el átomo de C al que se unen  $R_{26}$  y  $R_{27}$ , entonces están ausentes  $R_{25}$  y o  
 bien  $R_{26}$  o bien  $R_{27}$ ;

40 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de unión  
 a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo  
 monoclonal que se une de manera inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas, antígenos virales,  
 antígenos de células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con enfermedad  
 autoinmunitaria, antígenos microbianos, y preferiblemente un anticuerpo monoclonal que se une de manera  
 inmunoespecífica a antígenos de células cancerosas; y

45 n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con  
 respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo de desde 3  
 hasta 8.

4. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

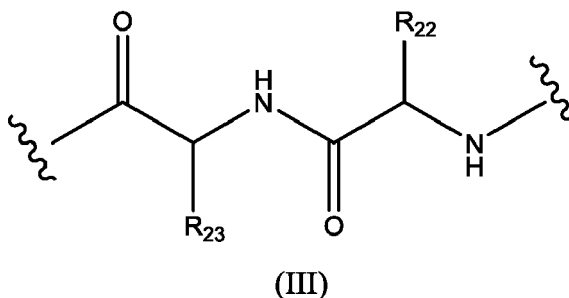


en las que:

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, -fenileno-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- en el que el grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, en los que cada de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto en la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, y preferiblemente R<sub>19</sub> es un grupo alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

R<sub>22</sub> se selecciona de metilo, bencilo, isopropilo, sec-butilo e indolilmetilo;

R<sub>23</sub> se selecciona de metilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>;

X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo en el que:

R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;

cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;

R<sub>3'</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo;

cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;

R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo;

5 cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente hidrógeno y metilo;

R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno y fenilo, preferiblemente hidrógeno;

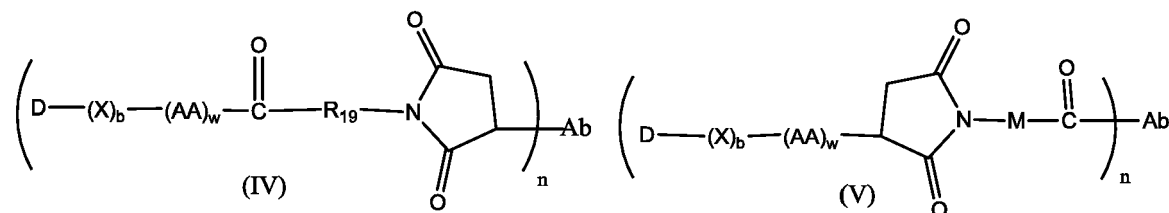
R<sub>27</sub> es un átomo de hidrógeno o un átomo de cloro;

cada par de carbonos unidos por una o más líneas discontinuas se une a través de dobles enlaces;

10 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en abciximab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, glembatumumab, gemtuzumab, ibritumomab, inotuzumab, labetuzumab, lorvotuzumab, milatuzumab, nimotuzumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, pinatuzumab, rituximab, vorsetuzumab, trastuzumab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13, o  
15 una porción inmunológicamente activa de los mismos, y preferiblemente el anticuerpo se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

20 5. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

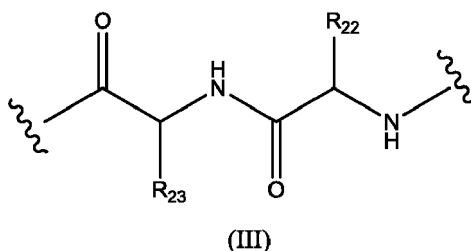


en las que:

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

25 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



en la que R<sub>22</sub> es isopropilo,

30 R<sub>23</sub> es-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

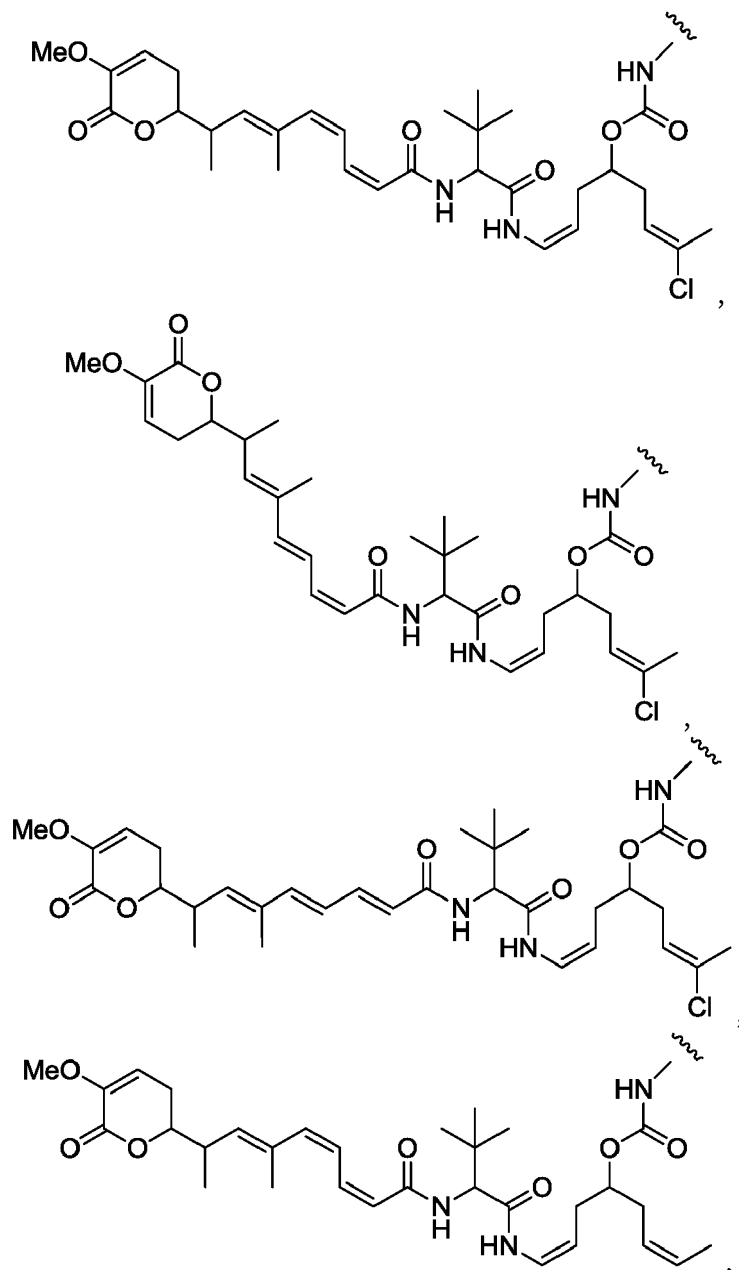
35 X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que

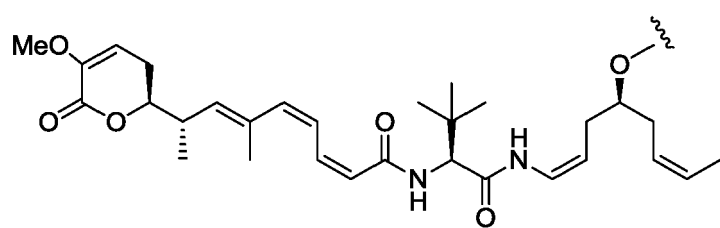
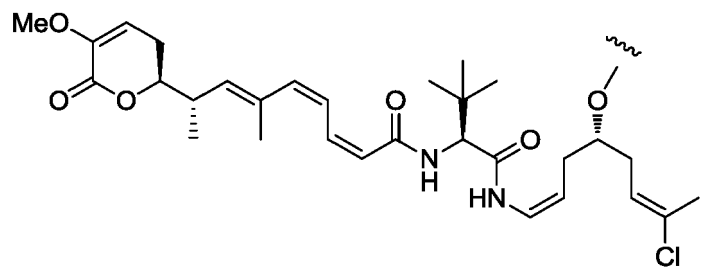
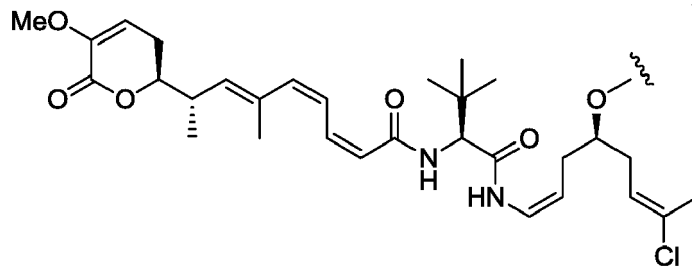
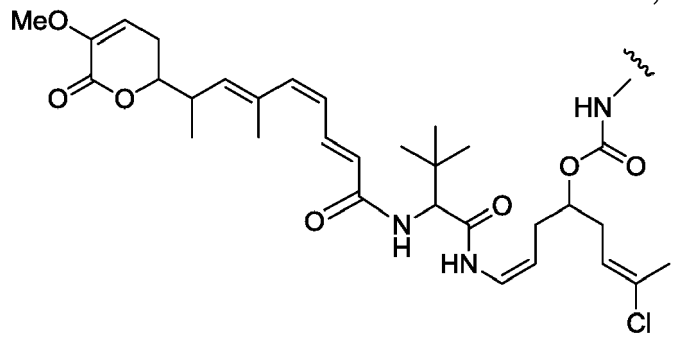
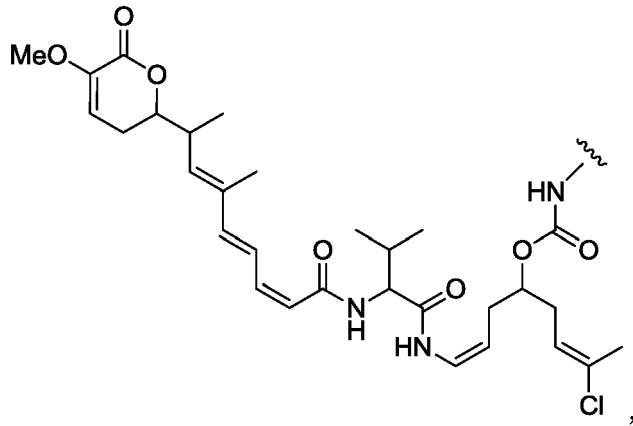
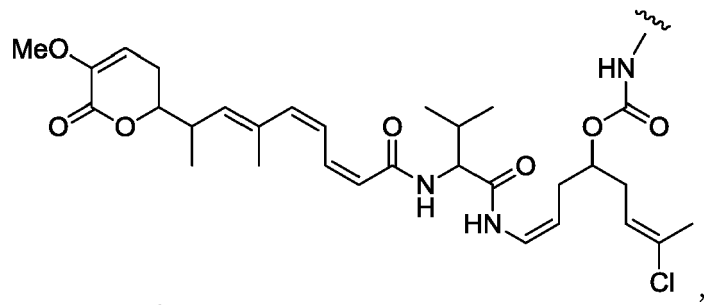
5

consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

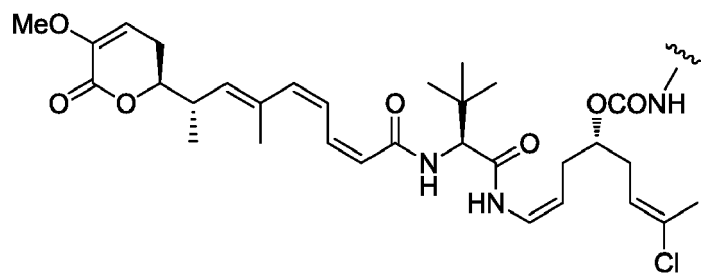
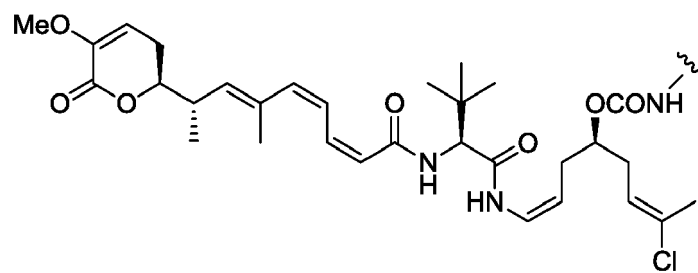
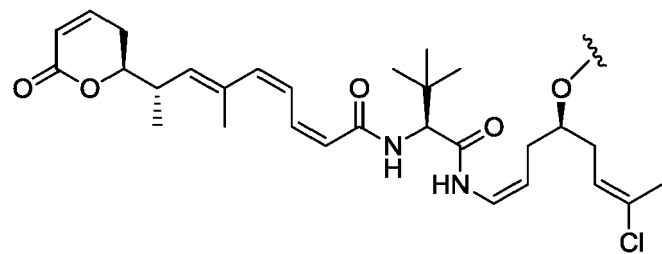
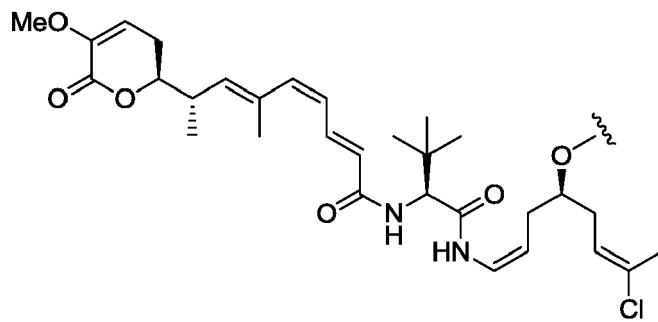
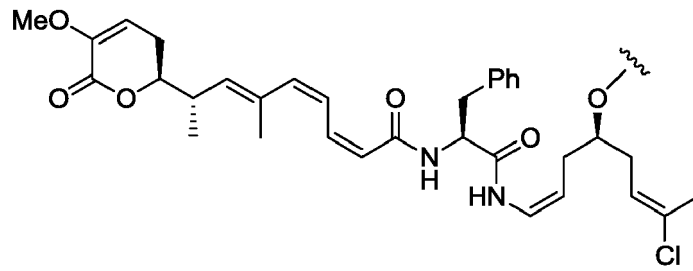
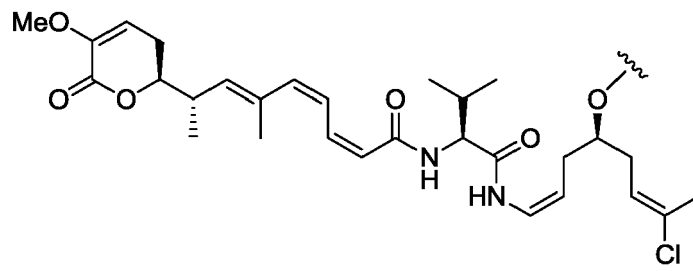
10

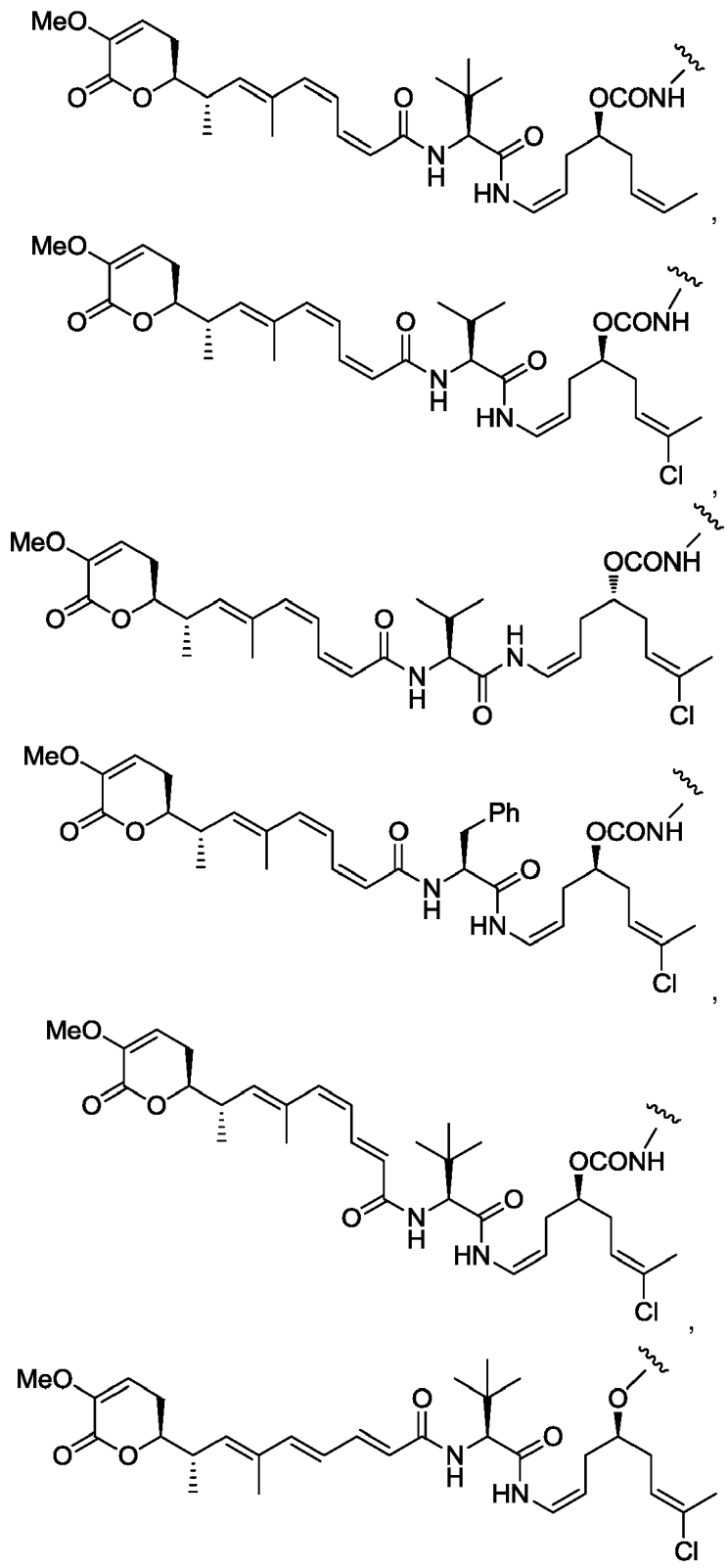
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado del siguiente grupo:

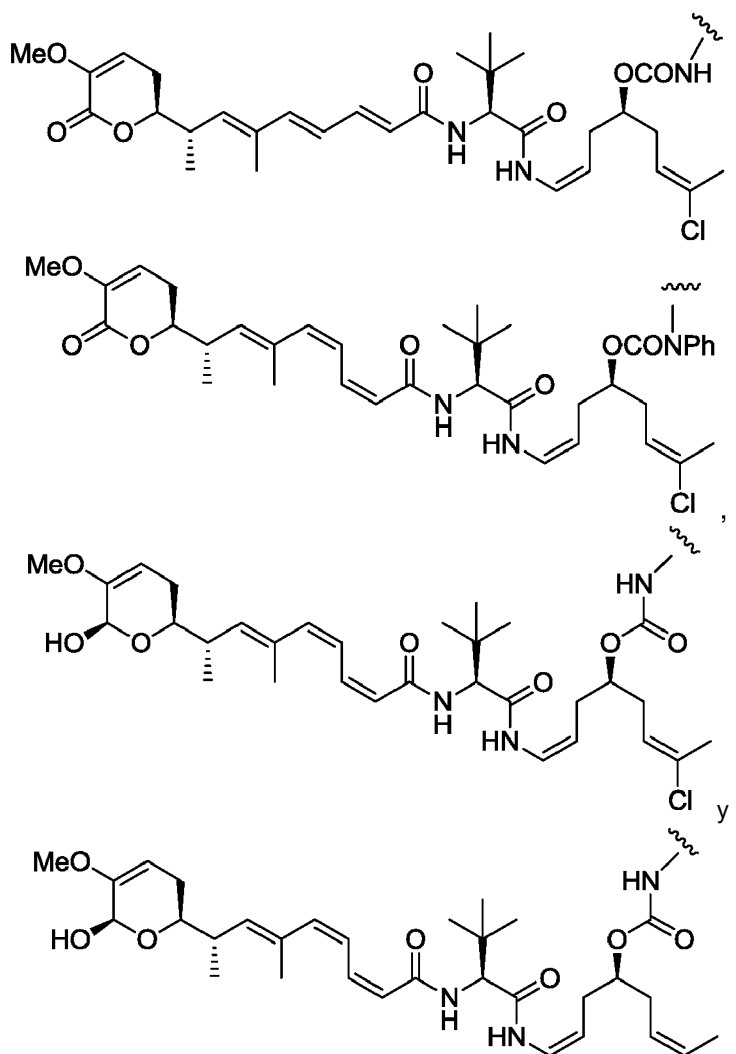












5 en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

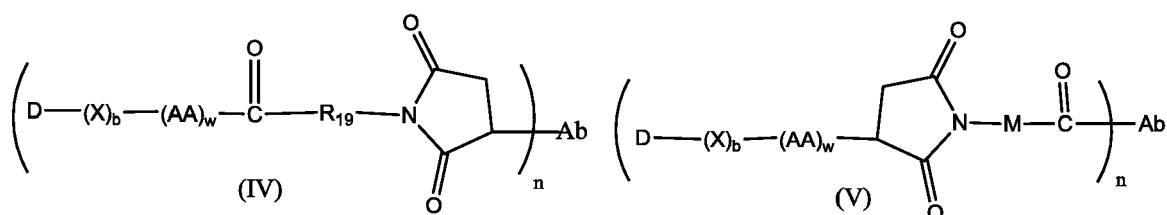
el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y

10 n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

6. Conjugado de fármaco según la reivindicación 5, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.

7. Conjugado de fármaco según la reivindicación 5, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.

8. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, seleccionado de las fórmulas (IV) y (V):

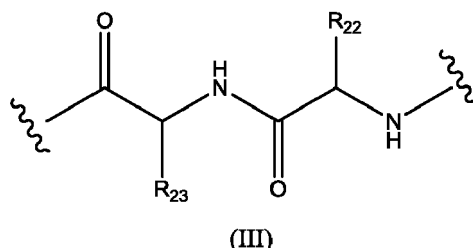


en las que:

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

M es -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-(carbociclo C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>)-;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



5

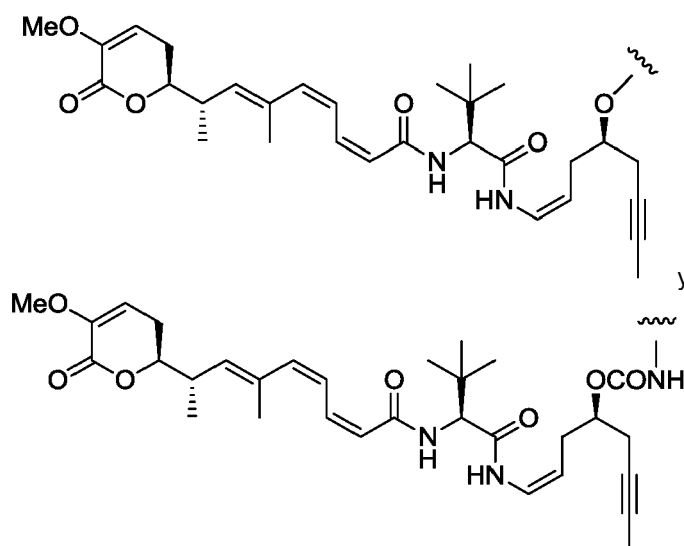
en la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha);

10

X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-;

20

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:



25

en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o al grupo de unión L;

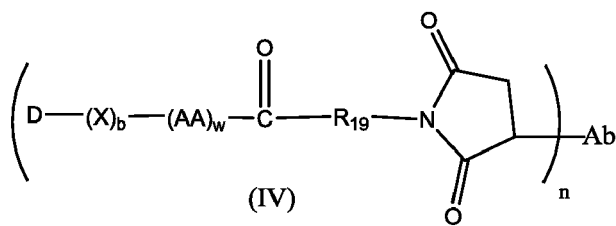
30

el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y

n es la razón del grupo [D-(X)<sub>b</sub>-(AA)<sub>w</sub>-(L)-] en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con

respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5.

9. Conjugado de fármaco según la reivindicación 4 o la reivindicación 8, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.
10. Conjugado de fármaco según la reivindicación 4 o la reivindicación 8, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.
11. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, de fórmula (IV):

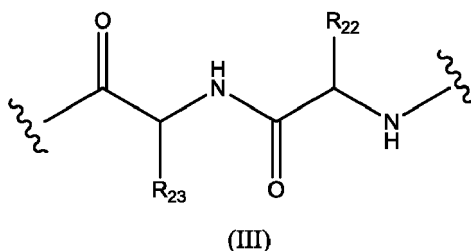


en la que:

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>5</sub>-;

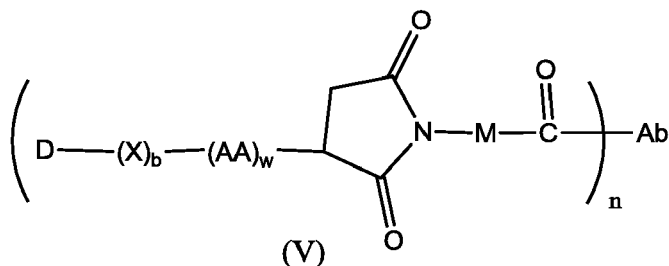
b es 1;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



en la que R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a (X)<sub>b</sub> si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOOCH<sub>2</sub>-fenileno-NH- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-; o de fórmula (V)



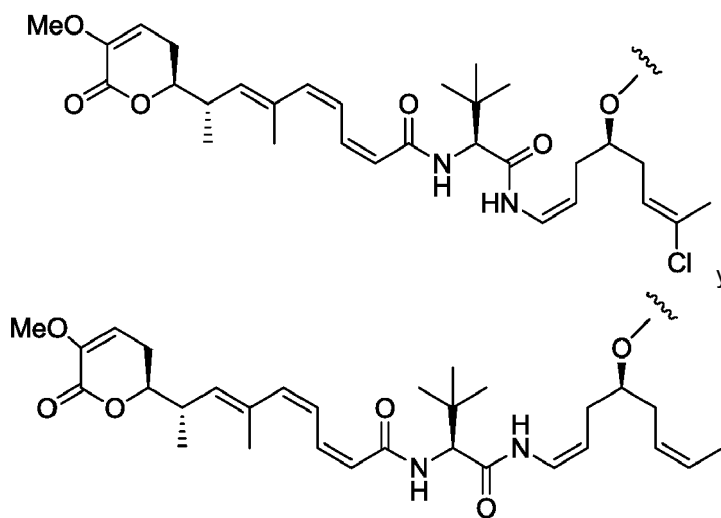
en la que M es -metil-ciclohexileno-;

b es 1;

w es 0; y

X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S- y -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:



en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

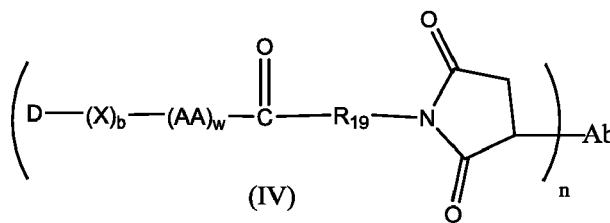
5 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y

10 n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en las fórmulas (IV) o (V) con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y preferiblemente 4.

12. Conjugado de fármaco según la reivindicación 11, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.

13. Conjugado de fármaco según la reivindicación 11, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.

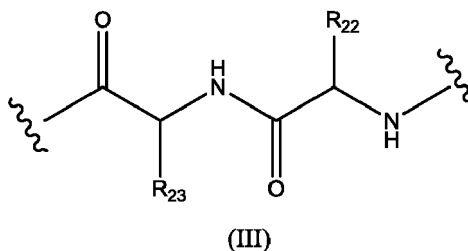
14. Conjugado de fármaco según la reivindicación 1, de fórmula (IV):



en la que  $R_{19}$  es -alquileo  $C_5$ ;

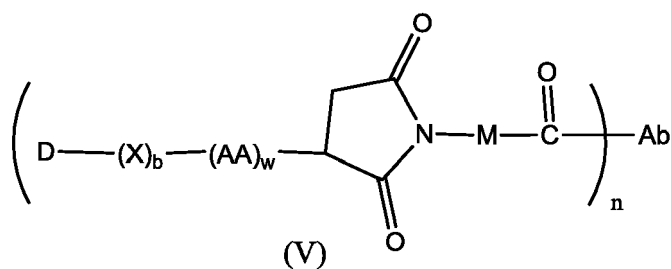
b es 1;

20 w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces  $(AA)_w$  es de fórmula (III):



en la que  $R_{22}$  es isopropilo,  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ , y las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a  $(X)_b$  si es que lo hay, o al resto de fármaco (la línea ondulada a la izquierda) y al grupo de unión (la línea ondulada a la derecha); y

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-(CH_2)_3NHCOOCH_2$ -fenileno-NH-, y  $-(CH_2)_3NH$ -; o de fórmula (V)



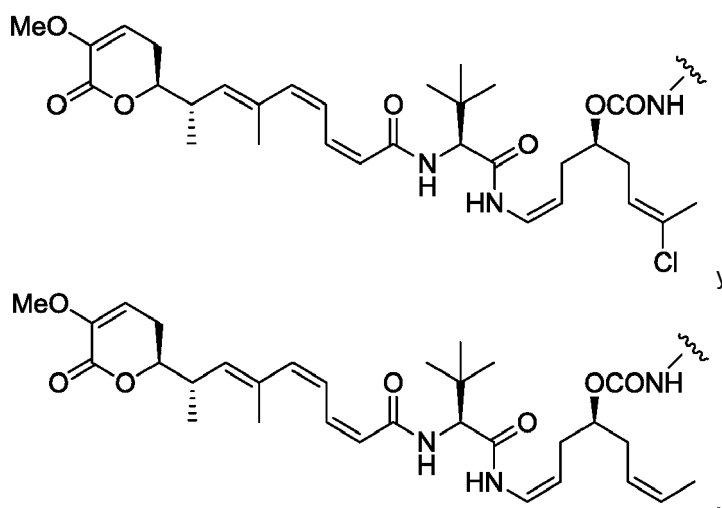
en la que M es -metil-ciclohexileno-;

5 b es 1;

w es 0; y

X es un grupo de extensión seleccionado de  $-(CH_2)_3S$ - y  $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2S$ -;

D es un resto de fármaco de fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:



10

en las que las líneas onduladas indican el punto de unión covalente a  $(X)_b$  si es que lo hay, o a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o al grupo de unión L;

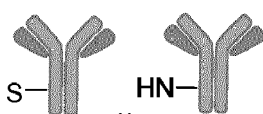
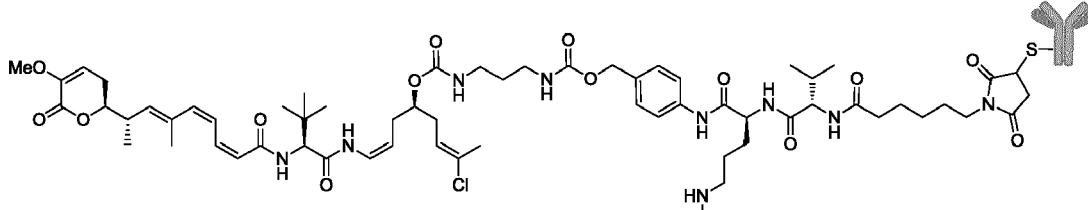
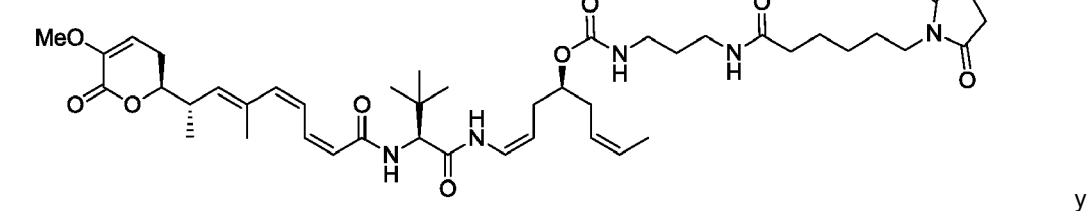
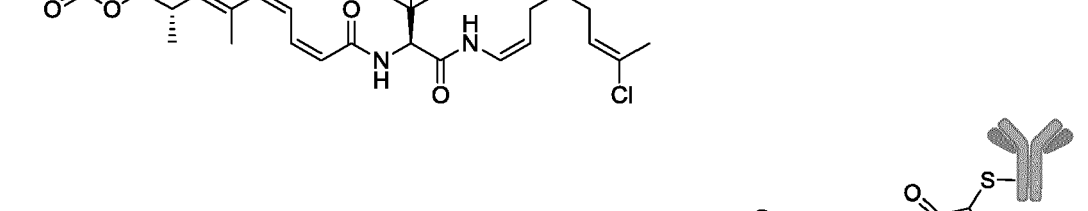
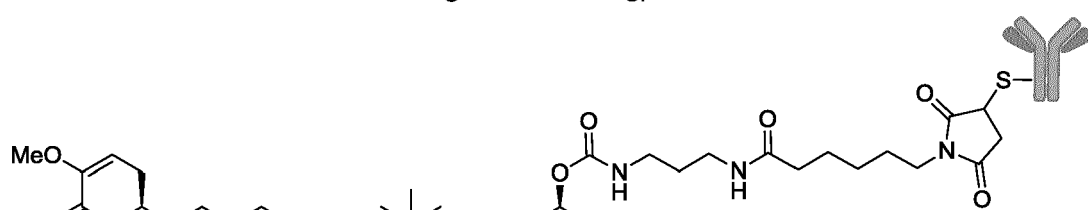
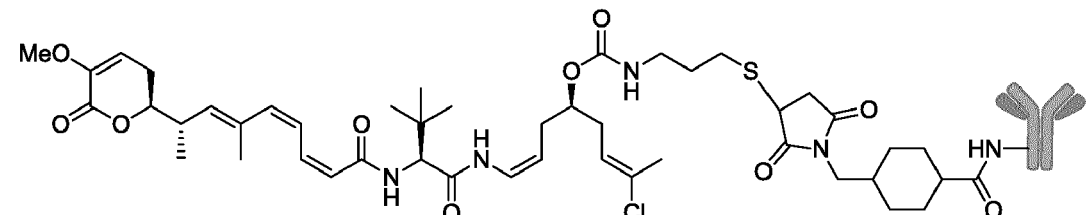
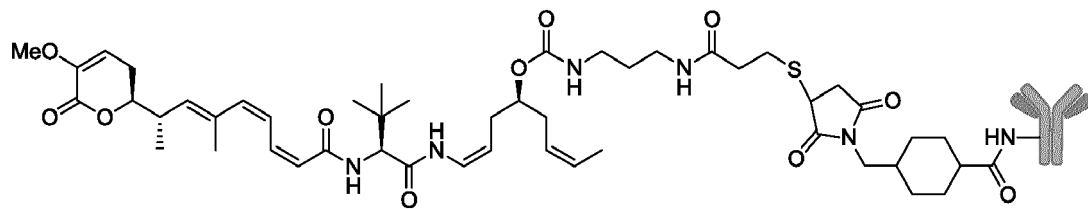
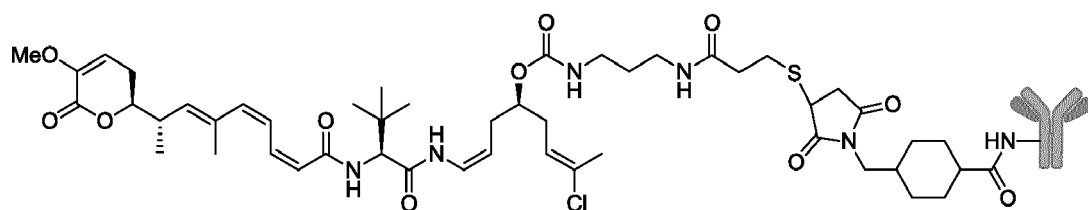
15 el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y una anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos; y

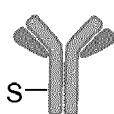
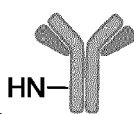
n es la razón del grupo  $[D-(X)_b-(AA)_w-(L)-]$  en el que L es tal como se define en (IV) o (V) con respecto al resto que comprende al menos un sitio de unión a antígeno y está en el intervalo desde 3 hasta 5, y preferiblemente 4.

20 15. Conjugado de fármaco según la reivindicación 14, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.

16. Conjugado de fármaco según la reivindicación 14, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.

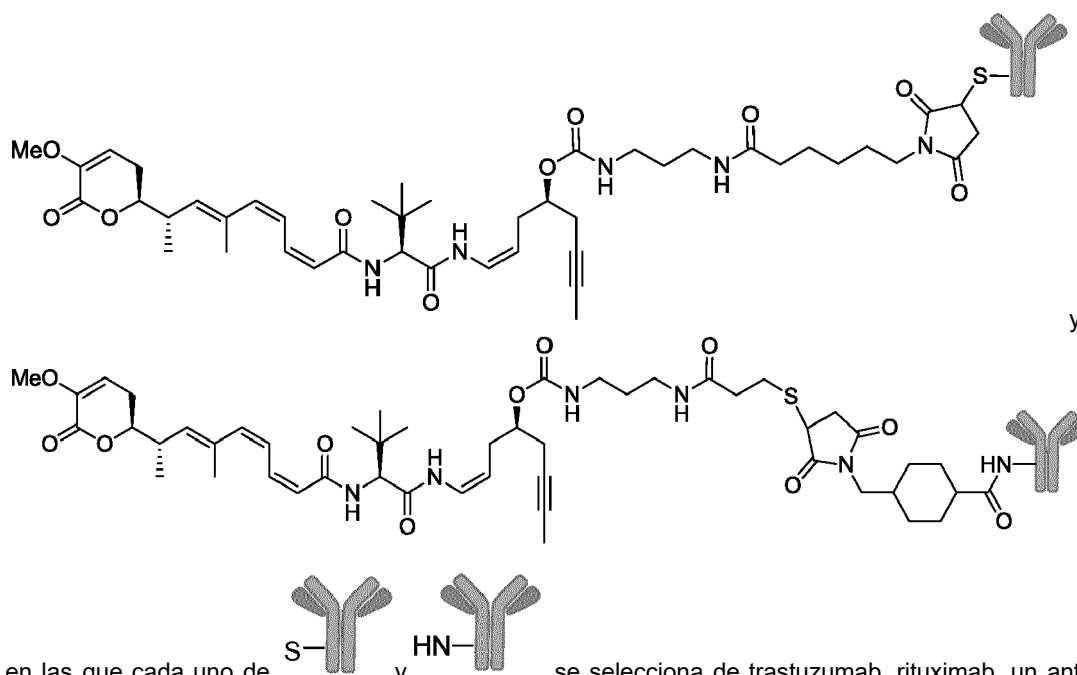
25 17. Conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 11, seleccionado del grupo que consiste en:



en las que cada uno de  y  se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.

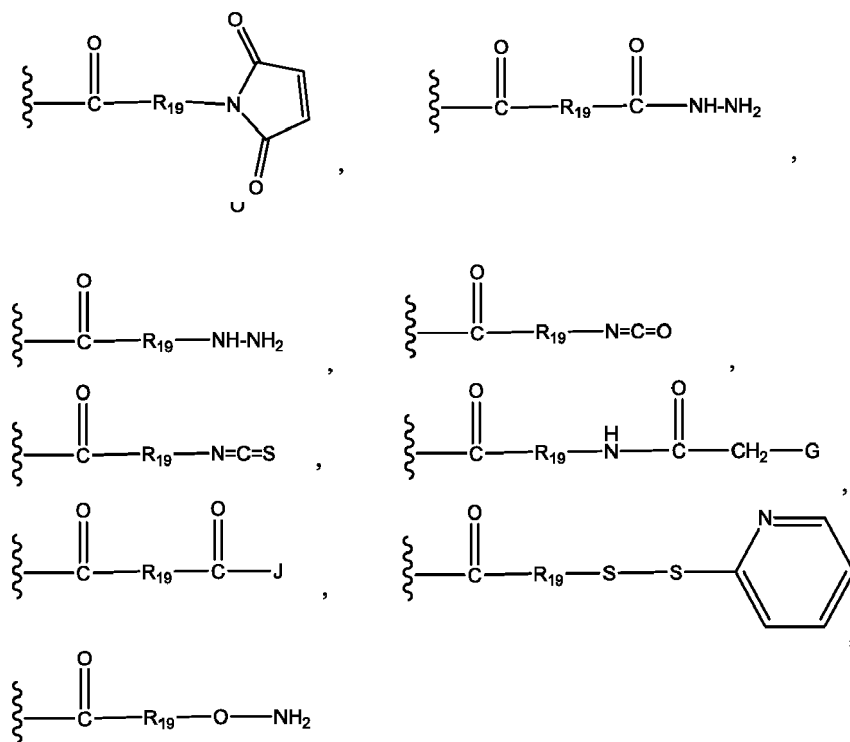
10 18. Conjugado de fármaco según la reivindicación 8, seleccionado del grupo que consiste en:





en las que cada uno de S- y HN- se selecciona de trastuzumab, rituximab, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD5 y un anticuerpo anti-CD13 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.

- 5
19. Conjugado de fármaco según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno se selecciona de trastuzumab, rituximab y un anticuerpo anti-CD4 o una porción inmunológicamente activa de los mismos.
- 10
20. Conjugado de fármaco según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el resto Ab que comprende al menos un sitio de unión a antígeno es trastuzumab o una porción inmunológicamente activa del mismo.
21. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H, en el que:
- L<sub>1</sub> es un grupo de unión seleccionado del grupo de fórmulas que consiste en:



15

en las que cada una de las líneas onduladas indica el punto de unión covalente a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a X;

G se selecciona de halógeno, -O-mesilo y -O-tosilo;

5 J se selecciona de halógeno, hidroxilo, -N-succinimidoxilo, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo, -O-tetrafluorofenilo y -O-C(O)-OR<sub>20</sub>;

10 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -O-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

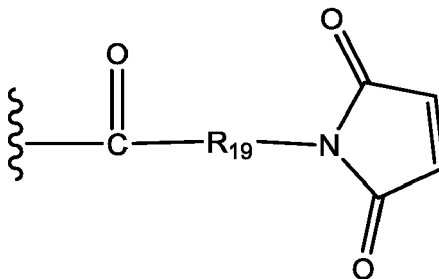
15 R<sub>20</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o un grupo arilo que tiene desde 6 hasta 18 átomos de carbono en uno o más anillos aromáticos, sustituyéndose opcionalmente dichos grupos arilo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

20 r es un número entero que oscila entre 1-10; y

25 cada uno de D, X, AA y w es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

22. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según la reivindicación 21, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de unión de fórmula:



30 en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a  $(AA)_w$  si es que lo hay, o a X;

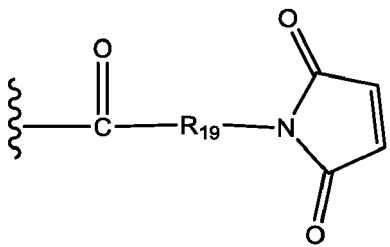
35 R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-(heterociclo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)- en el que dicho grupo heterociclo puede ser un grupo saturado o insaturado que tiene uno o más anillos y que comprende al menos un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre en dicho(s) anillo(s), sustituyéndose opcionalmente dicho grupo con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>- y -CH<sub>2</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

r es un número entero que oscila entre 1-6; y

cada uno de D, X, AA y w es tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

23. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según la reivindicación 21, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de unión de fórmula:



5

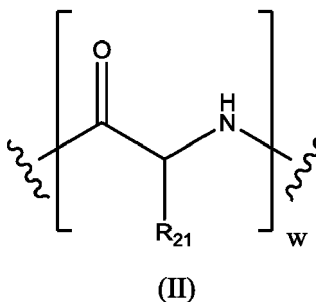
en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a un (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, -arileno C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>- en el que el grupo arileno está en uno o más anillos que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

10

(AA)<sub>w</sub> es de fórmula (II):



15

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a L<sub>1</sub> o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

en la que R<sub>21</sub> se selecciona, en cada caso, del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, sec-butilo, bencilo, indolilmetilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, y w es un número entero desde 0 hasta 6;

20

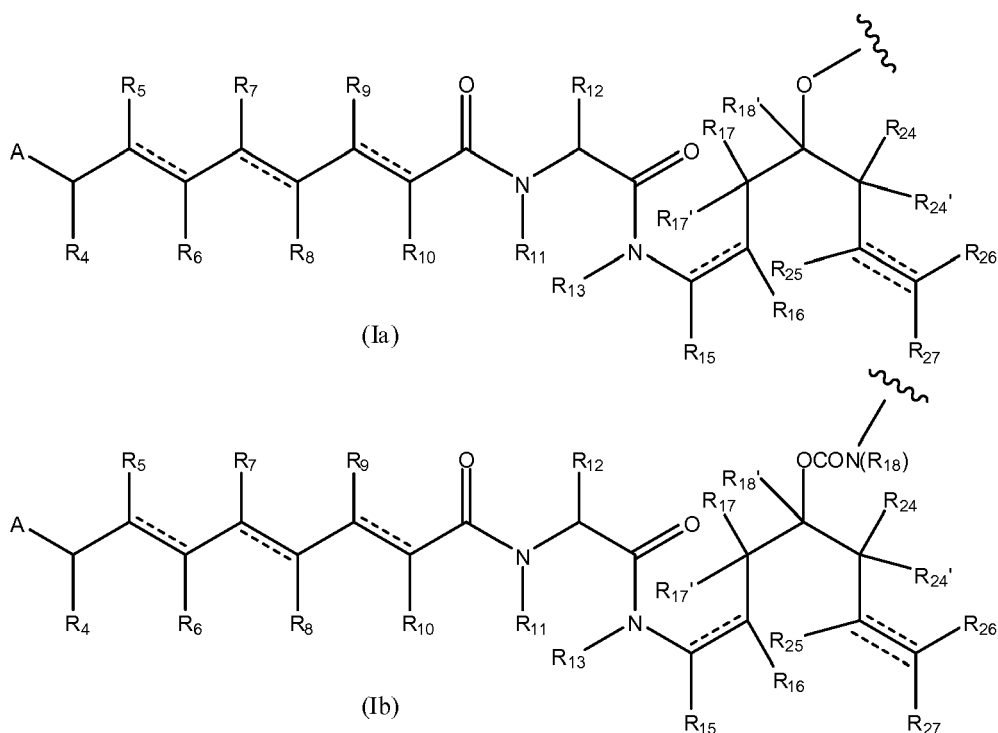
X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -COCH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

25

30

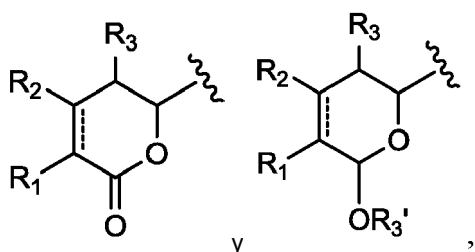
35

D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo:



en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a X;

A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, OR<sub>a</sub> y OCOR<sub>a</sub>, en los que R<sub>a</sub> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

10 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>3</sub>' se selecciona de hidrógeno, COR<sub>a</sub>, y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

15 cada uno de R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> y R<sub>12</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido y no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>18</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

20 hidrógeno y grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituidos o no sustituidos en los que los sustituyentes opcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos oxo, átomos de halógeno, OCOR<sub>y</sub>, OCOOR<sub>y</sub>, COR<sub>y</sub>, COOR<sub>y</sub>, OCONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, CONR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>R<sub>z</sub>, NR<sub>y</sub>COR<sub>z</sub> en los que cada uno de R<sub>y</sub> y R<sub>z</sub> se selecciona de átomos de hidrógeno y grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

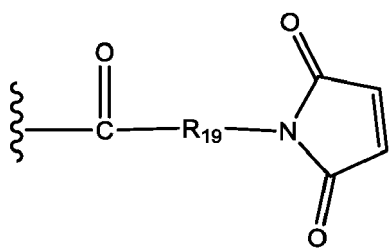
R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> que puede sustituirse opcionalmente con al menos un grupo R<sub>x</sub> y un grupo fenilo que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

R<sub>27</sub> se selecciona de hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, en el que los sustituyentes opcionales son uno o más sustituyentes R<sub>x</sub>;

5 y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.

24. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según la reivindicación 21, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de fórmula:



10

en la que:

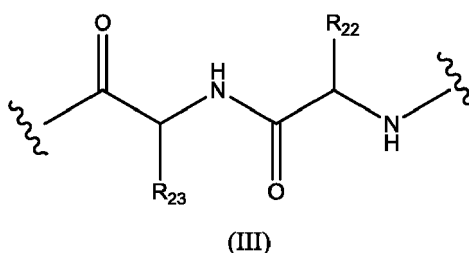
la línea ondulada indica el punto de unión covalente a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

15

R<sub>19</sub> se selecciona de -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-, fenileno-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>- en el que el grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, en los que cada uno de los sustituyentes de alquileo anteriores, ya sea o bien solos o bien unidos a otro resto en la cadena de carbono, puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos arilo que tienen desde 6 hasta 12 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, y preferiblemente R<sub>19</sub> es un grupo alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

20

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



25

en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a L<sub>1</sub> o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

R<sub>22</sub> se selecciona de metilo, bencilo, isopropilo, sec-butilo e indolilmetilo;

R<sub>23</sub> se selecciona de metilo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>;

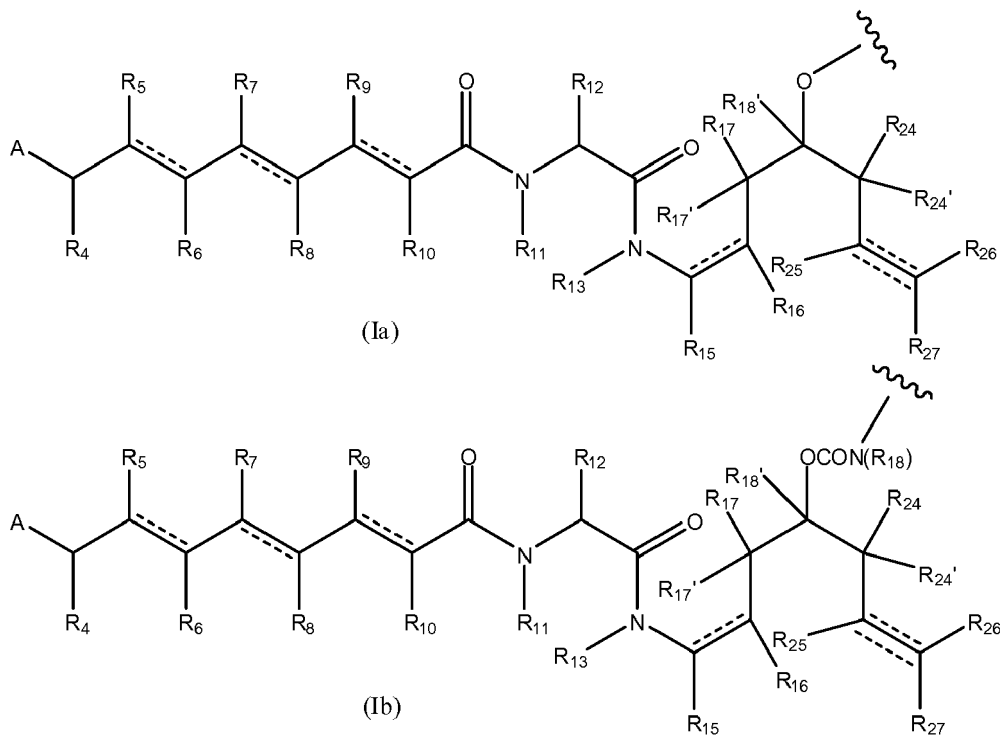
30

X es un grupo de extensión seleccionado de -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -CONH(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCOO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

35

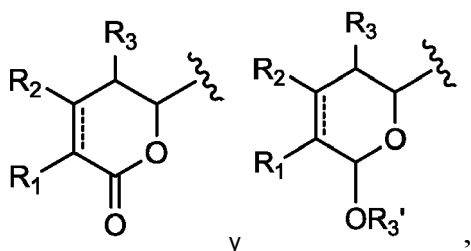
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un

solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo:



en las que las líneas onduladas de (Ia) y (Ib) indican el punto de unión covalente a X;

5 A se selecciona de



en las que las líneas onduladas del resto A indican el punto de unión covalente al resto del resto de fármaco;

R<sub>1</sub> es hidrógeno o metoxilo;

10 cada uno de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> es hidrógeno;

R<sub>3'</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>10</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub> es metilo;

R<sub>12</sub> es isopropilo, terc-butilo o bencilo;

15 cada uno de R<sub>11</sub> y R<sub>13</sub> es hidrógeno;

cada uno de R<sub>15</sub>, R<sub>16</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>17'</sub>, R<sub>18'</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>24'</sub>, R<sub>25</sub> y R<sub>26</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, preferiblemente hidrógeno y metilo;

R<sub>18</sub> se selecciona de hidrógeno y fenilo, y preferiblemente hidrógeno;

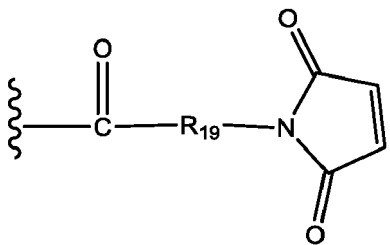
R<sub>27</sub> es hidrógeno o halógeno;

20 y cada línea discontinua representa un enlace adicional opcional, pero cuando existe un triple enlace entre

el átomo de C al que se une R<sub>25</sub> y el átomo de C al que se unen R<sub>26</sub> y R<sub>27</sub>, entonces están ausentes R<sub>25</sub> y o bien R<sub>26</sub> o bien R<sub>27</sub>.

25. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según la reivindicación 21, en el que:

L<sub>1</sub> es un grupo de unión de fórmula:



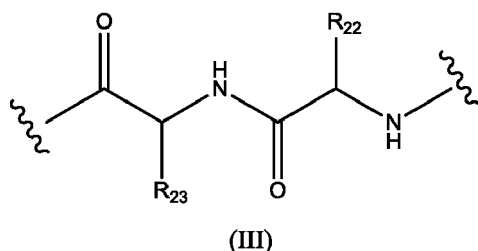
5

en la que:

la línea ondulada indica el punto de unión covalente a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;

R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-;

w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



10

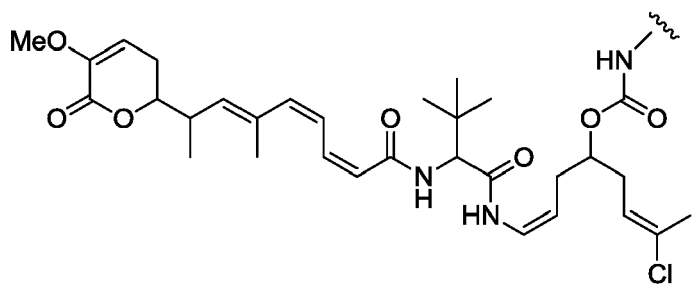
R<sub>22</sub> es isopropilo, R<sub>23</sub> es-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a L<sub>1</sub> o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

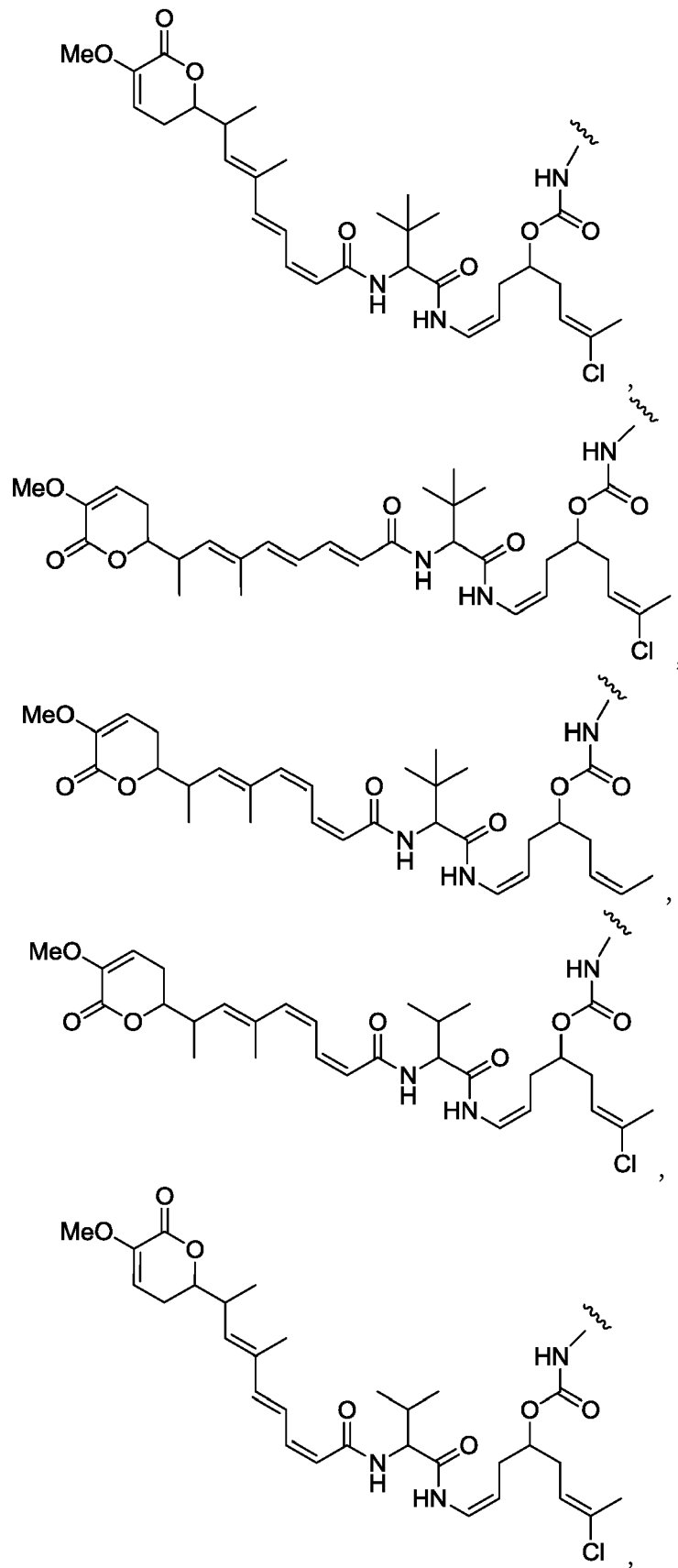
15

X es un grupo de extensión seleccionado del grupo que consiste en -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-, -COO-CH<sub>2</sub>-fenileno-NH-, en el que dicho grupo fenileno puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COOCH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -CONH-(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NHCO(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)S-, -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH- y -(alquileo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)NH-COO-CH<sub>2</sub>-(fenileno que puede sustituirse opcionalmente con desde uno hasta cuatro sustituyentes R<sub>x</sub> seleccionados del grupo que consiste en grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, grupos alcoxilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, átomos de halógeno, grupos nitro y grupos ciano)-NH-; y

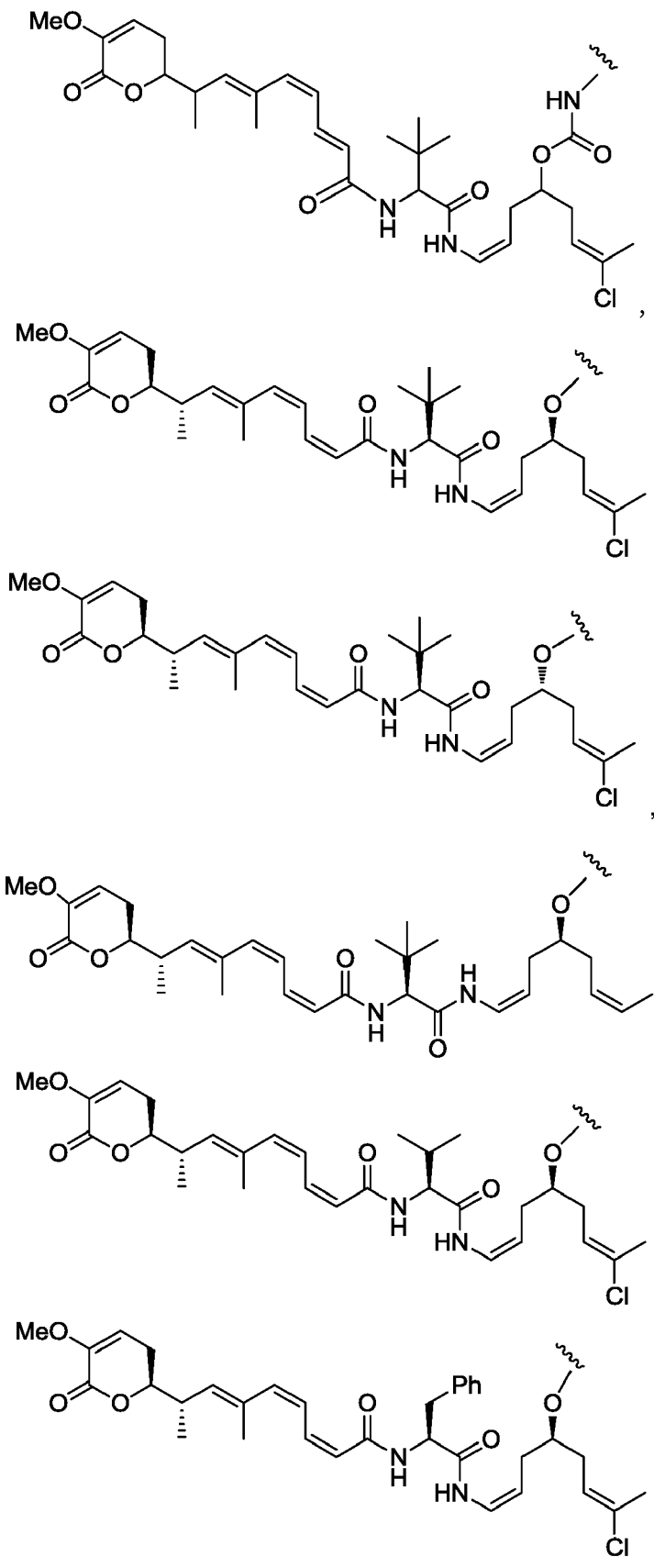
25

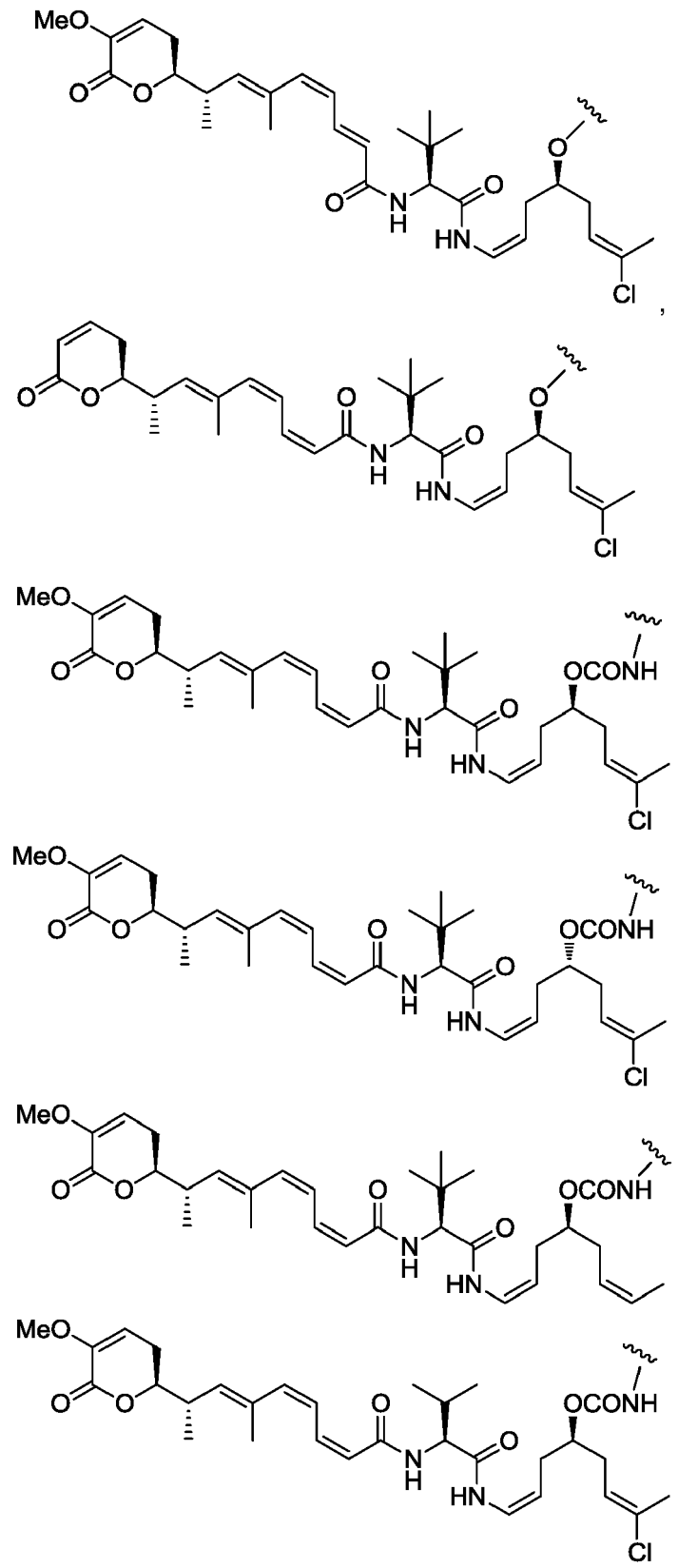
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia) o fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado del siguiente grupo:



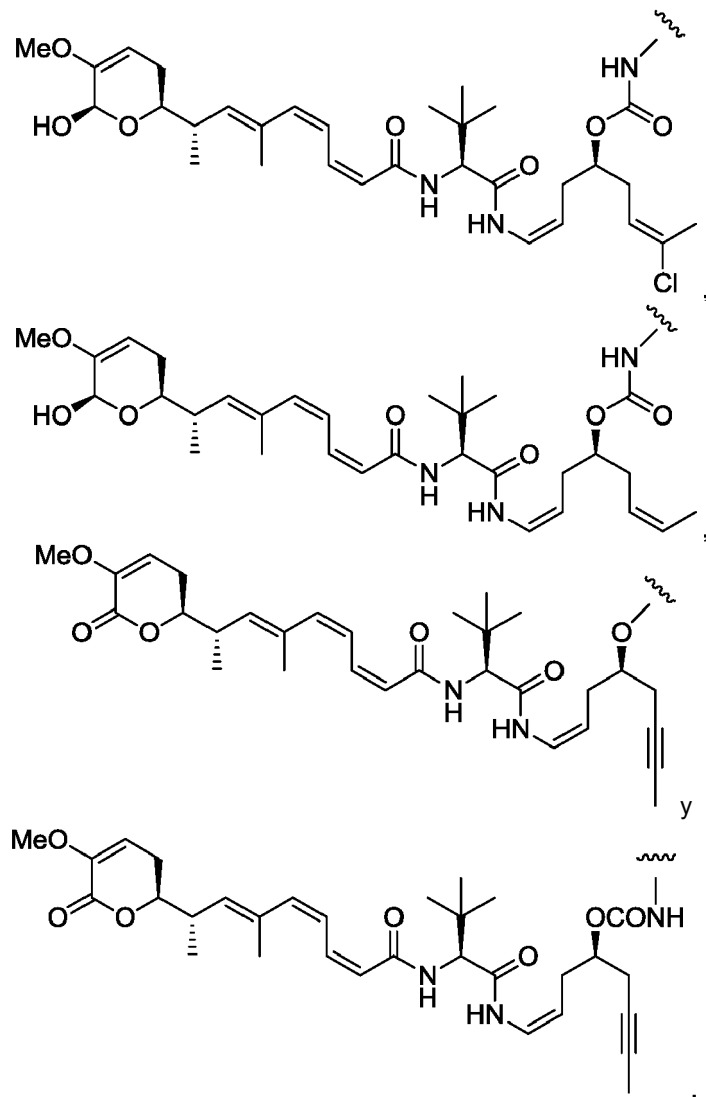




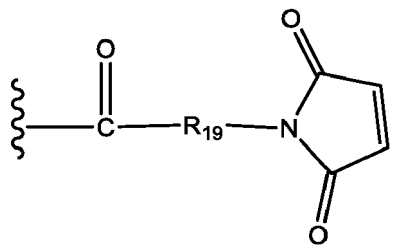






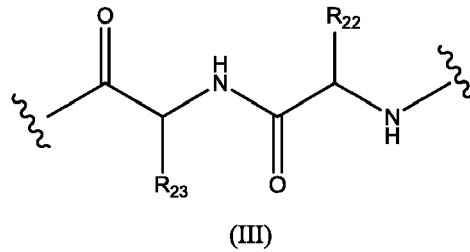


- 5 en las que la línea ondulada indica el punto de unión covalente a X.
26. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-L<sub>1</sub> o de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según la reivindicación 21, en el que L<sub>1</sub> es un grupo de fórmula:



en la que:

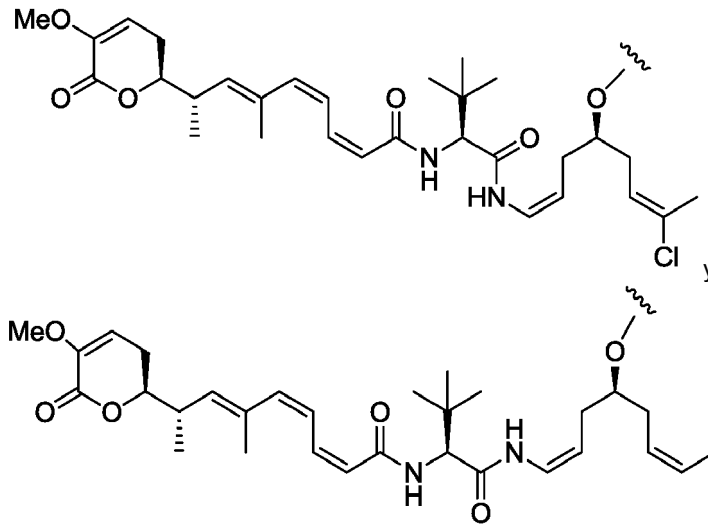
- 10 la línea ondulada indica el punto de unión covalente a (AA)<sub>w</sub> si es que lo hay, o a X;
- R<sub>19</sub> es -alquileo C<sub>5</sub>-;
- w es 0 ó 2, y cuando w es 2, entonces (AA)<sub>w</sub> es de fórmula (III):



en la que  $R_{22}$  es isopropilo,  $R_{23}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ , en la que las líneas onduladas indican el punto de uniones covalentes a X (la línea ondulada a la izquierda) y a  $L_1$  o a un átomo de hidrógeno (la línea ondulada a la derecha);

- 5 X es un grupo de extensión seleccionado de  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOOCH}_2\text{-fenileno-NH-}$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH-}$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{-S-}$  y  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{S-}$ ; y

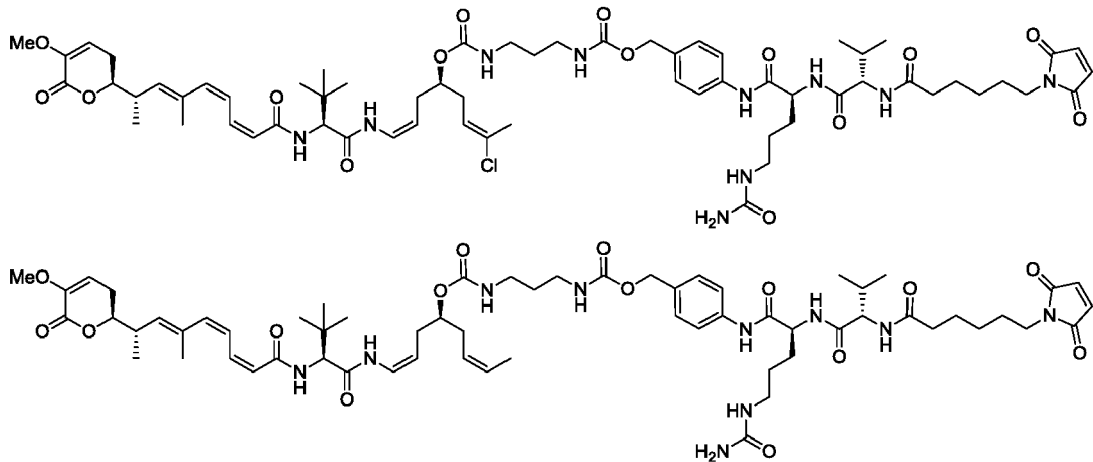
D es un resto de fármaco de fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable, un éster, un solvato, un tautómero o un estereoisómero del mismo seleccionado de:

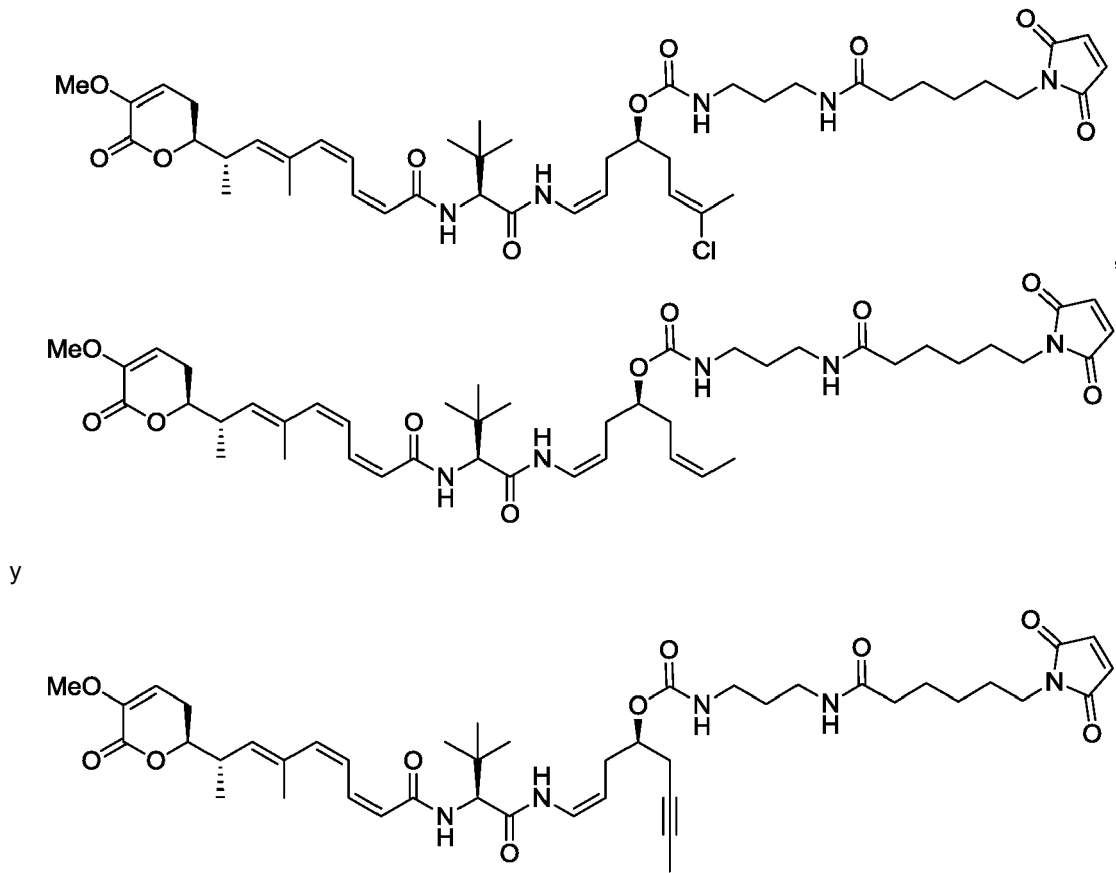


10

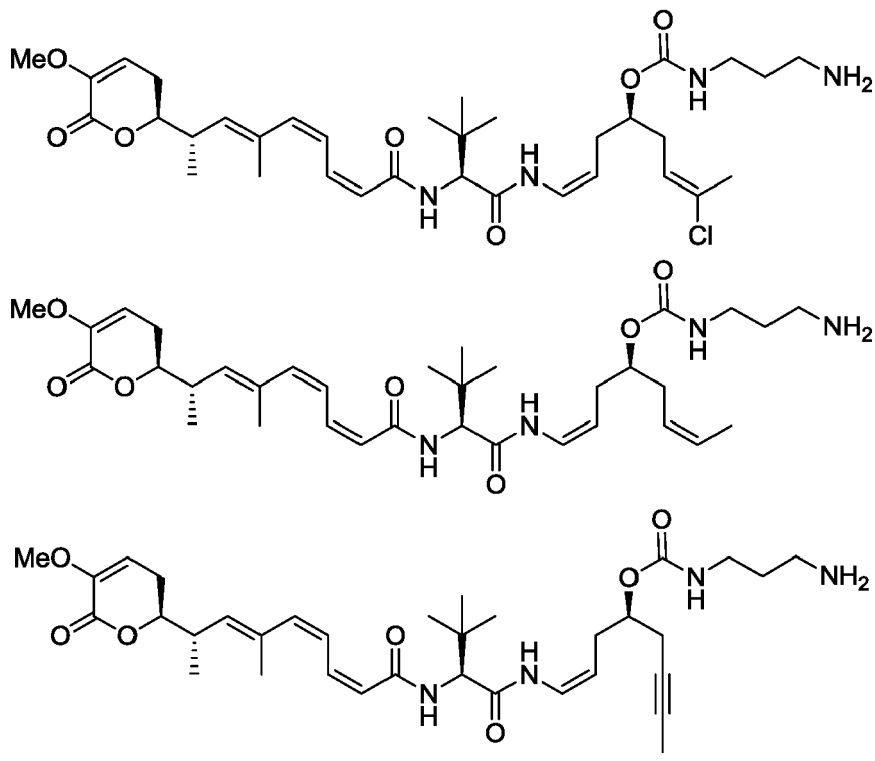
en las que la línea ondulada indica el punto de unión covalente a X.

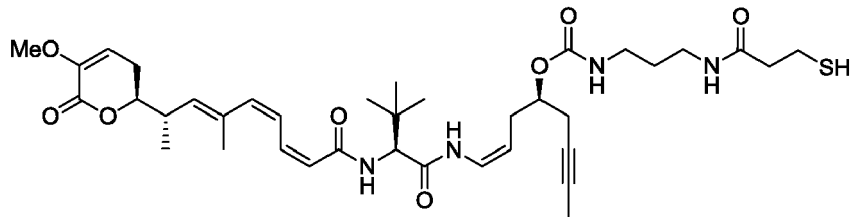
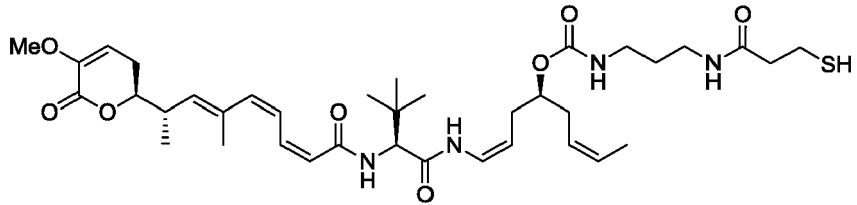
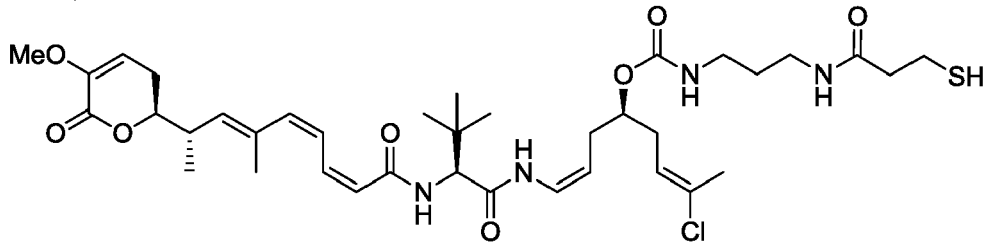
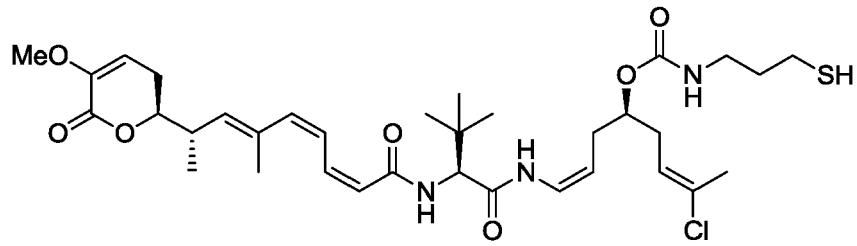
27. Compuesto de fórmula  $\text{D-X}(\text{AA})_w\text{-L}_1$  según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, seleccionado de:





5 28. Compuesto de fórmula D-X-(AA)<sub>w</sub>-H según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, seleccionado de:





- 5 29. Conjugado de fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso como medicamento.
30. Conjugado de fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en el tratamiento de cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de páncreas, cáncer de riñón, leucemia, mieloma múltiple, linfoma y cáncer de ovario.
- 10 31. Composición farmacéutica que comprende un conjugado de fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, y un portador farmacéuticamente aceptable.

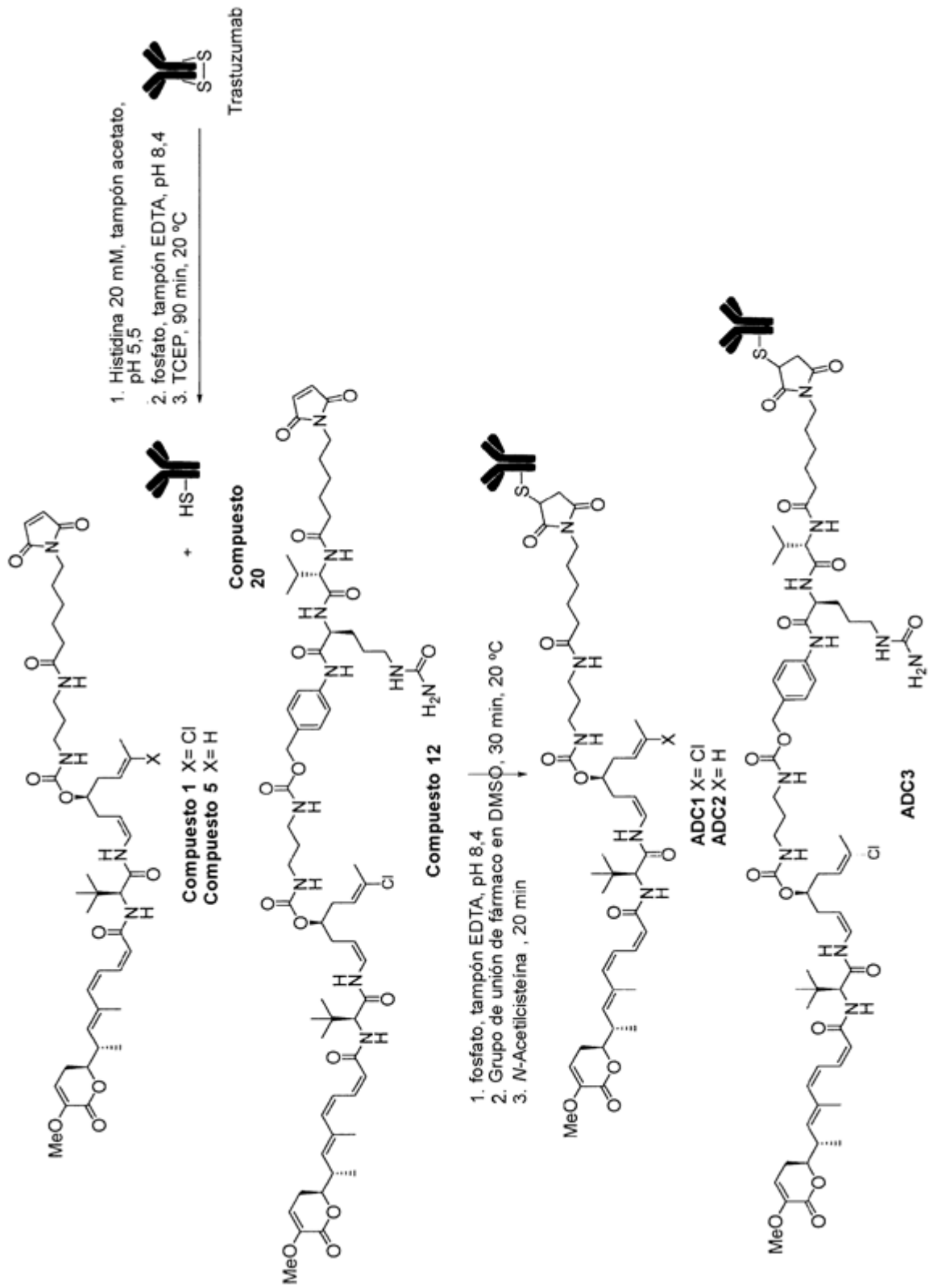


Figura 1



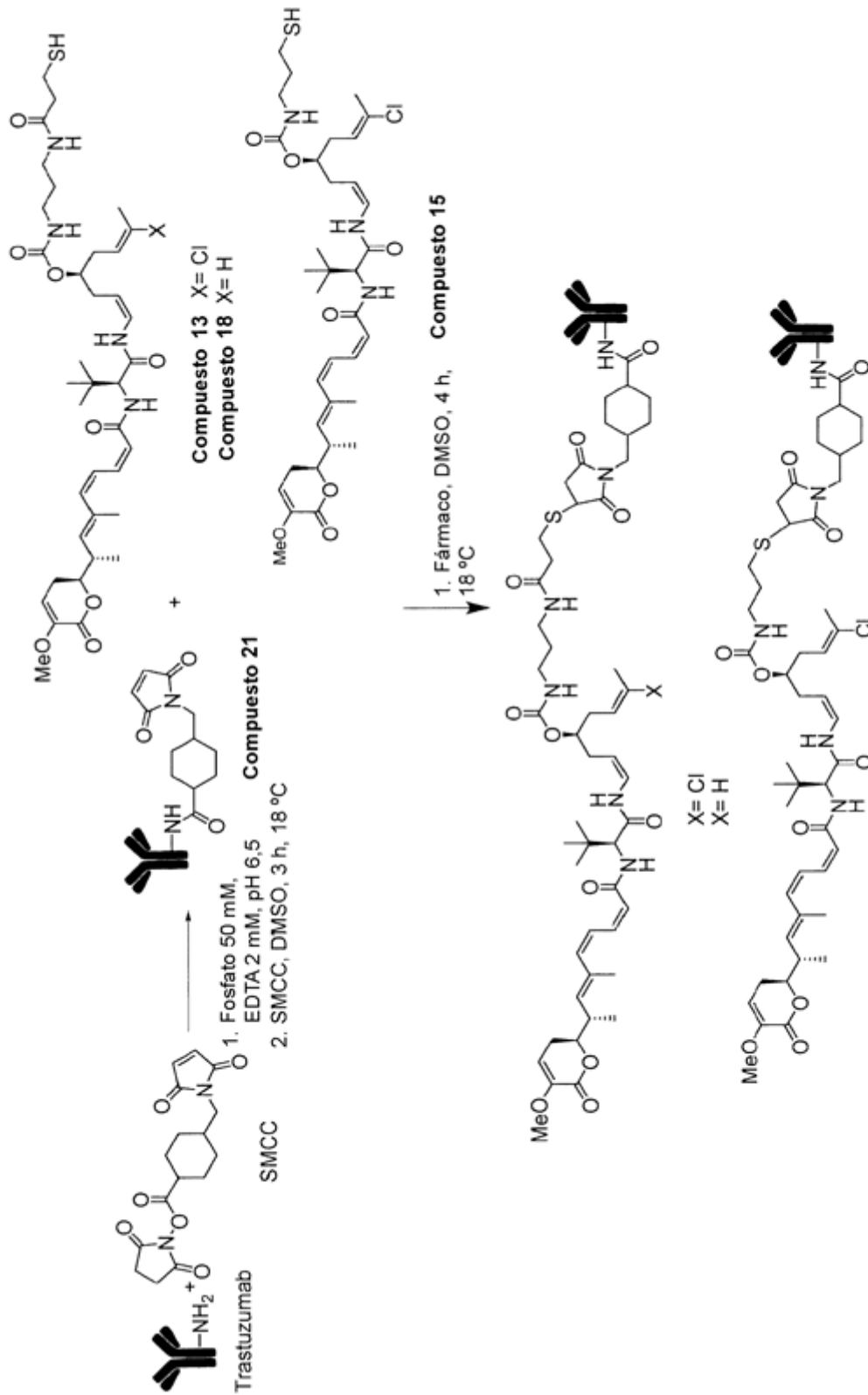


Figura 2

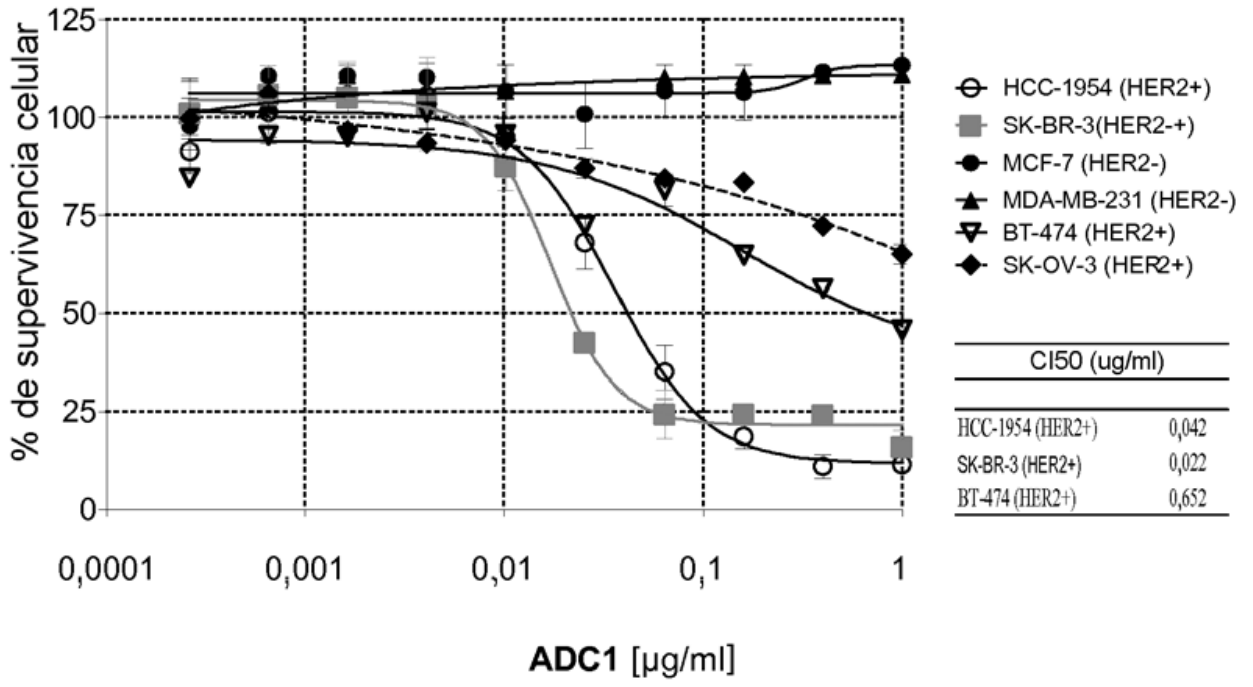
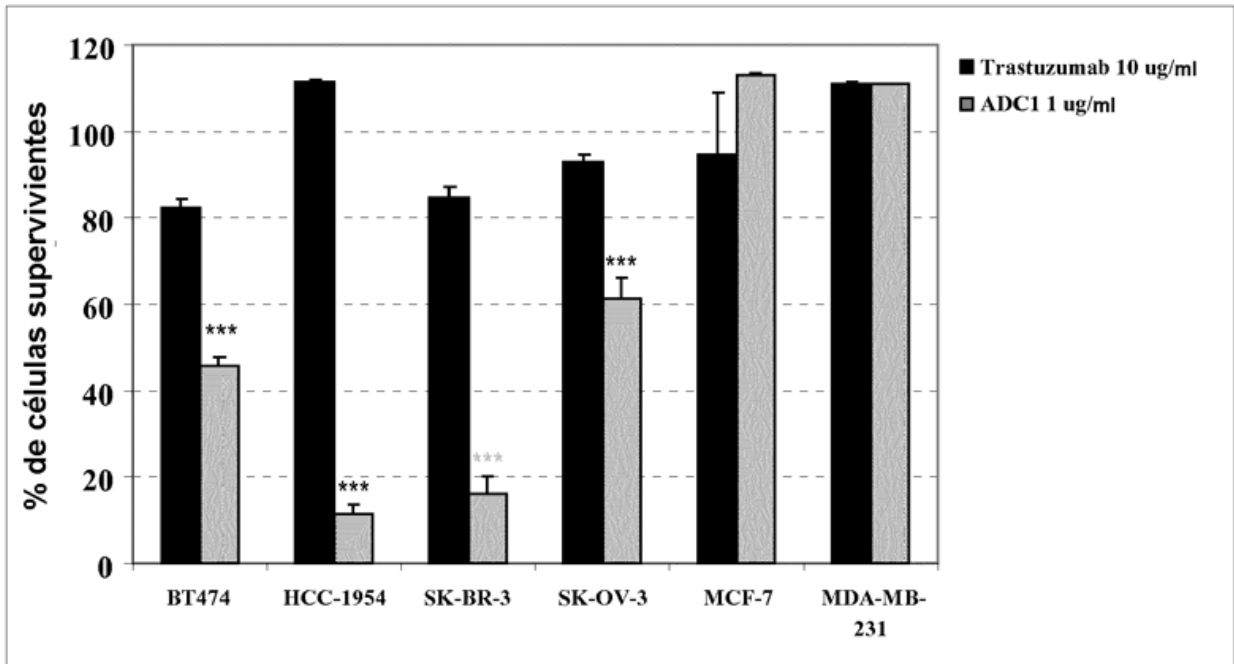
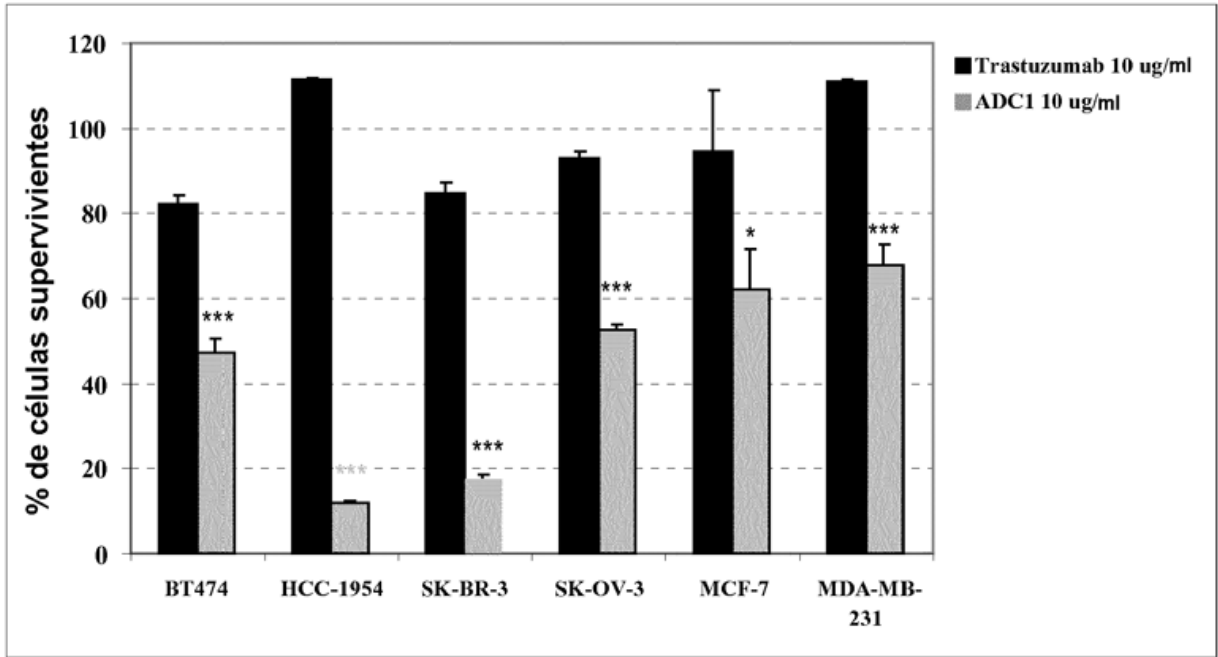


Figura 3



Significación estadística (prueba de la t de Student): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

Figura 4

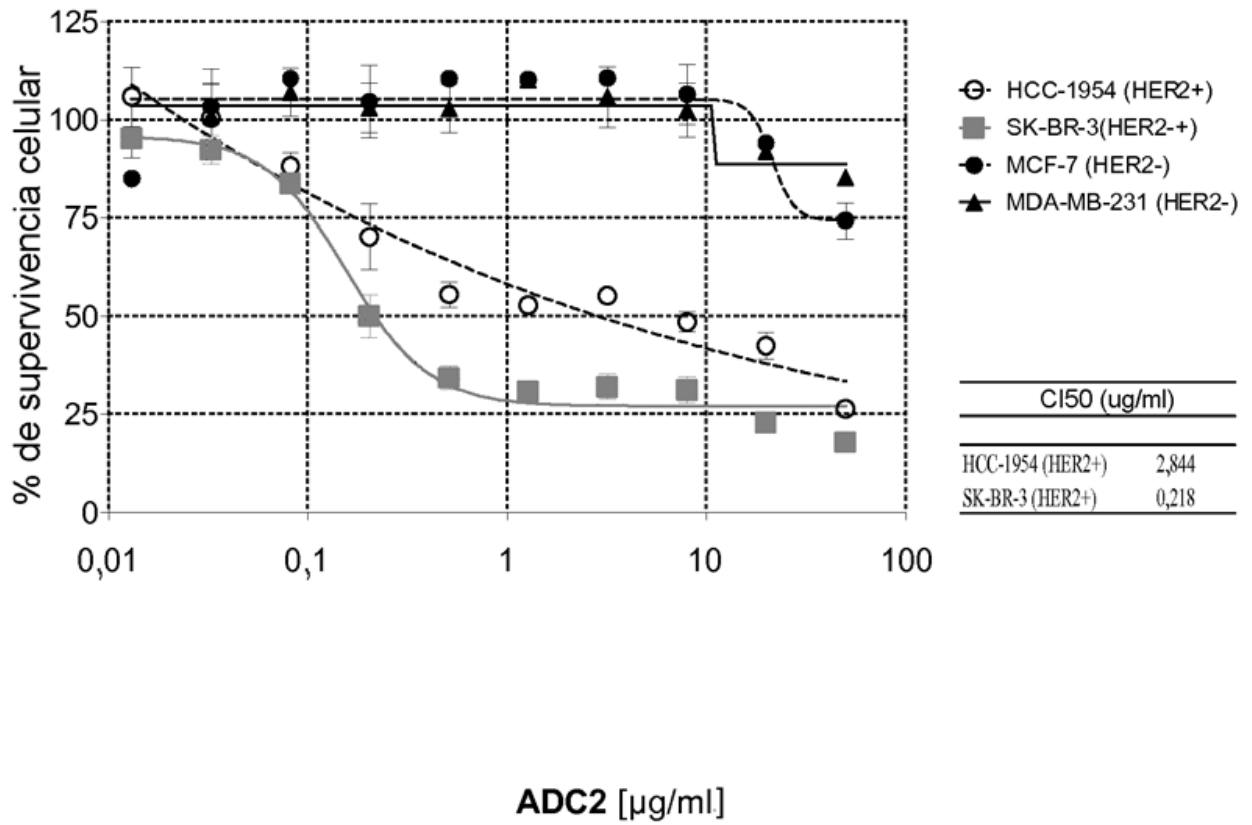
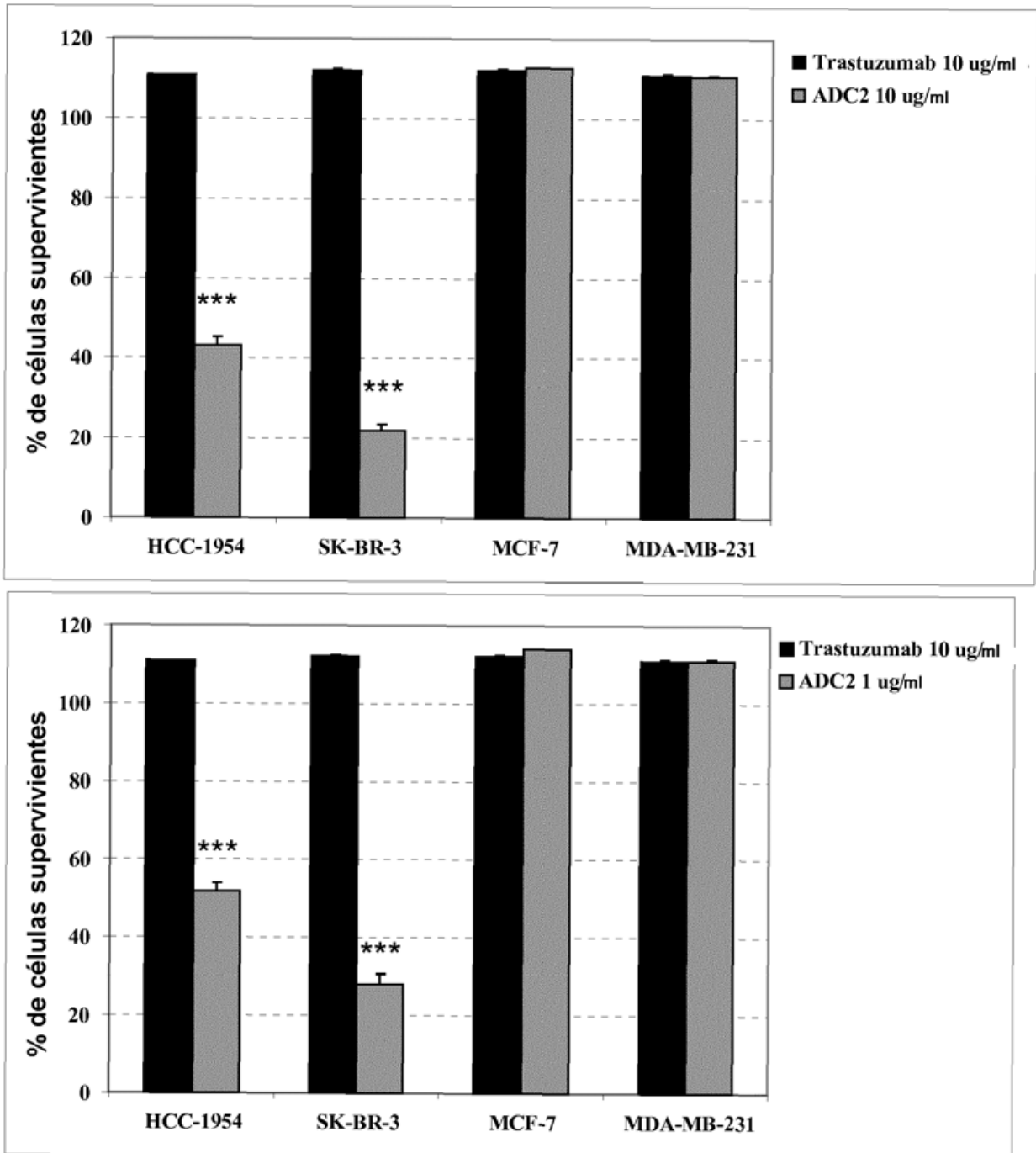


Figura 5



Significación estadística (prueba de la t de Student): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

Figura 6

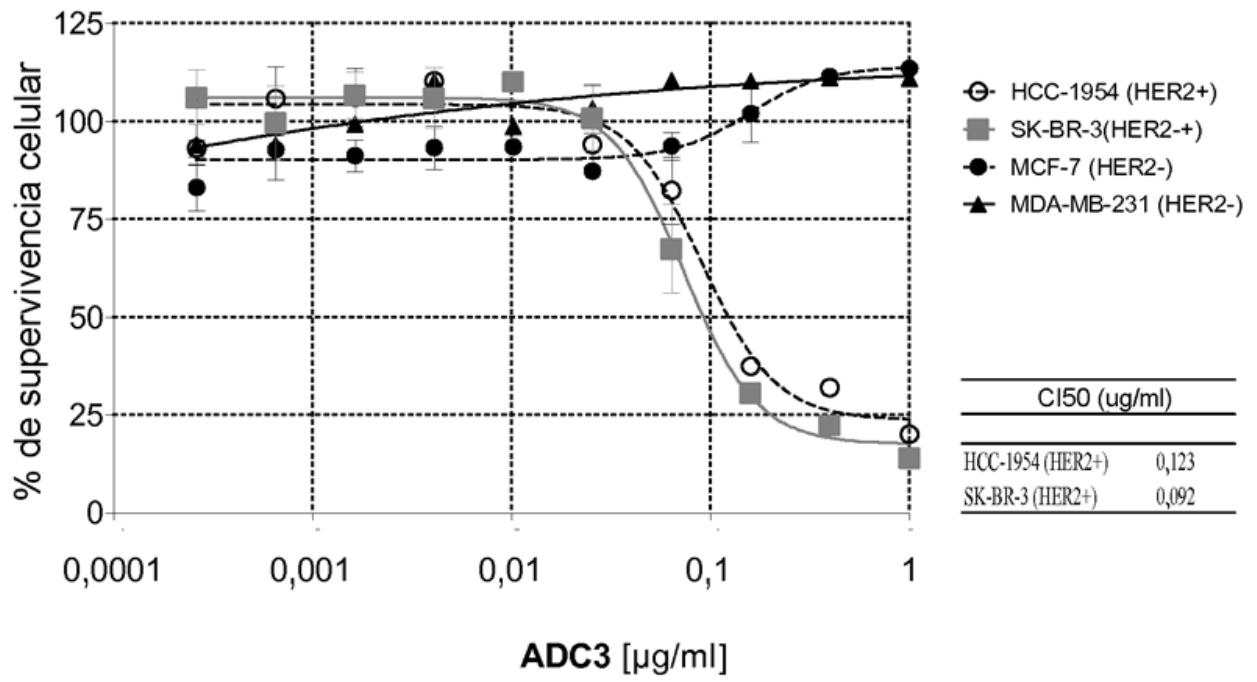
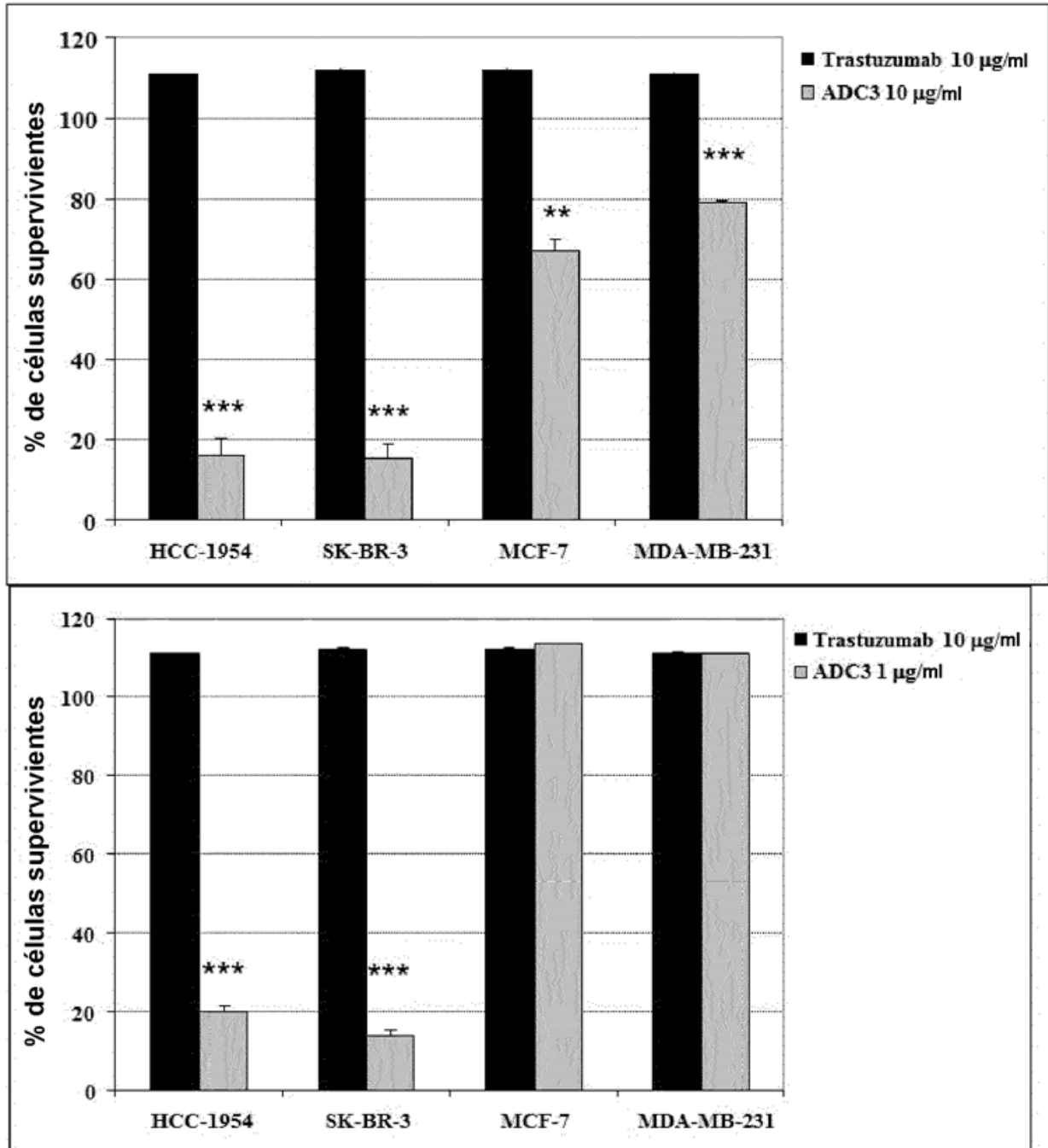


Figura 7

Figura 8



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

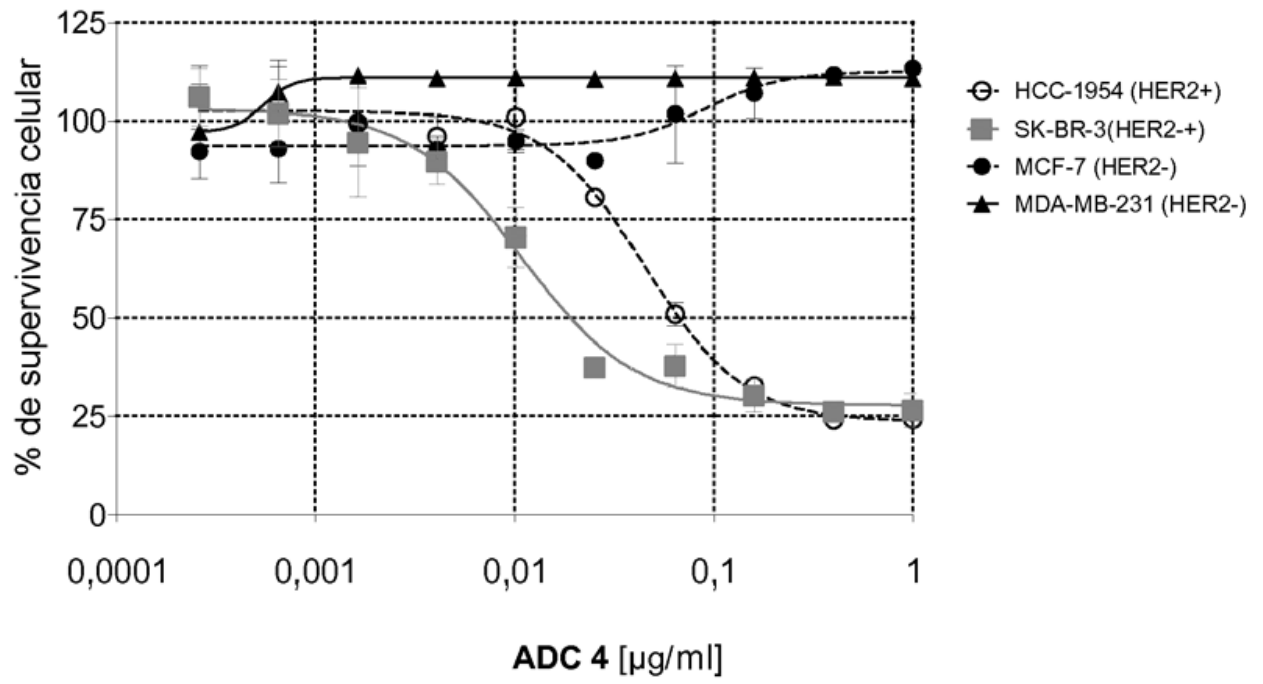
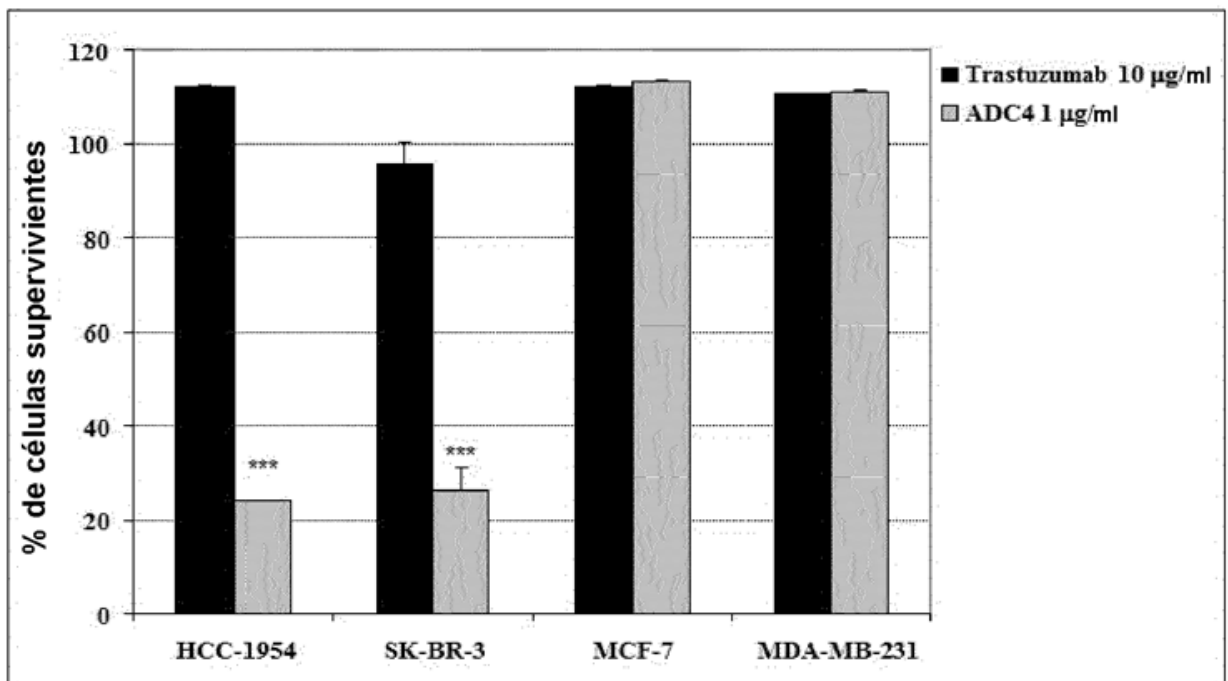
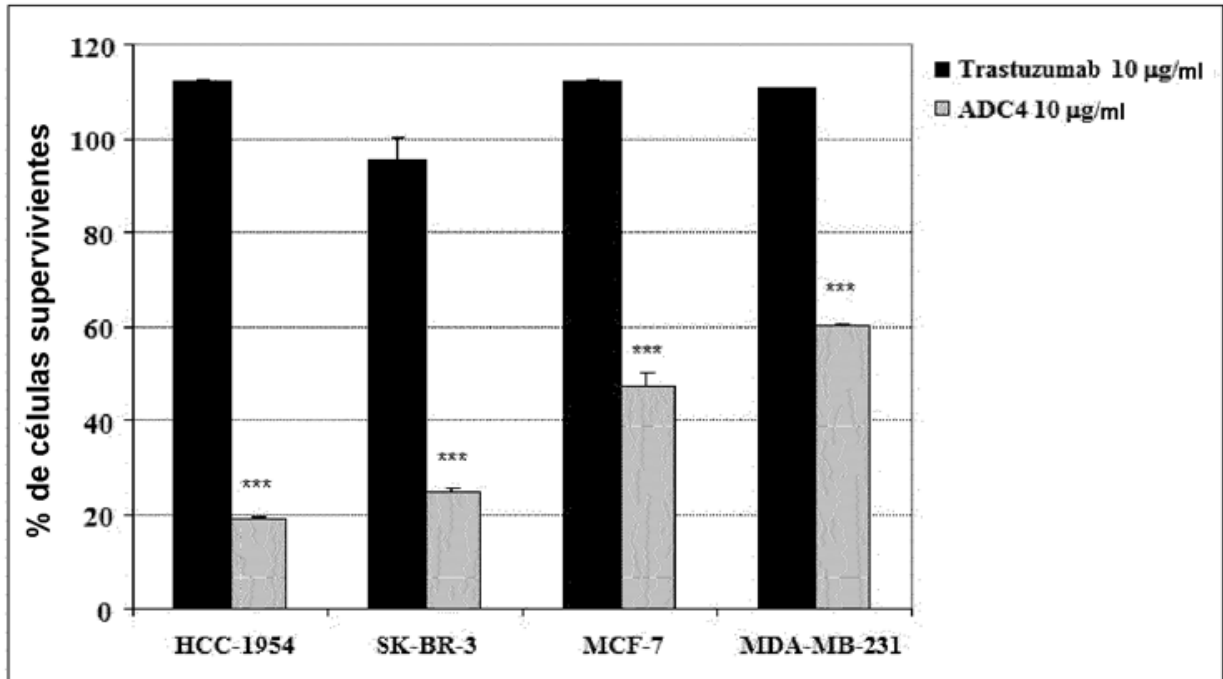


Figura 9



Figura 10



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\*  $p < 0,001$

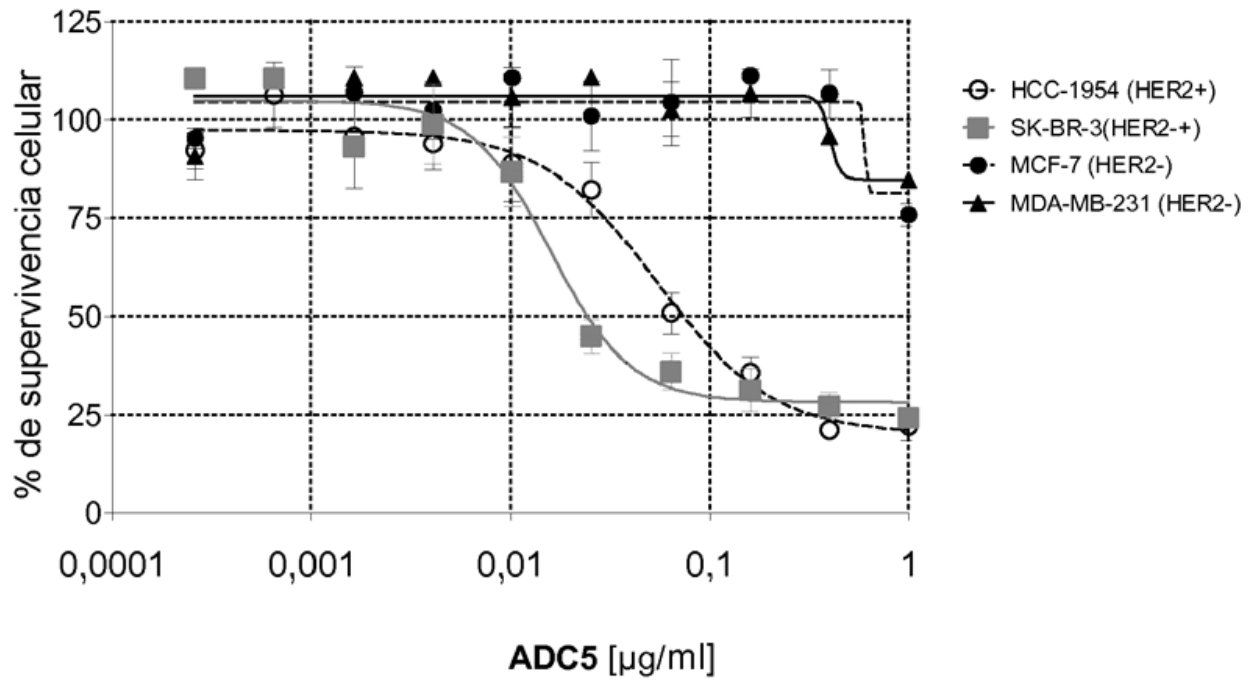
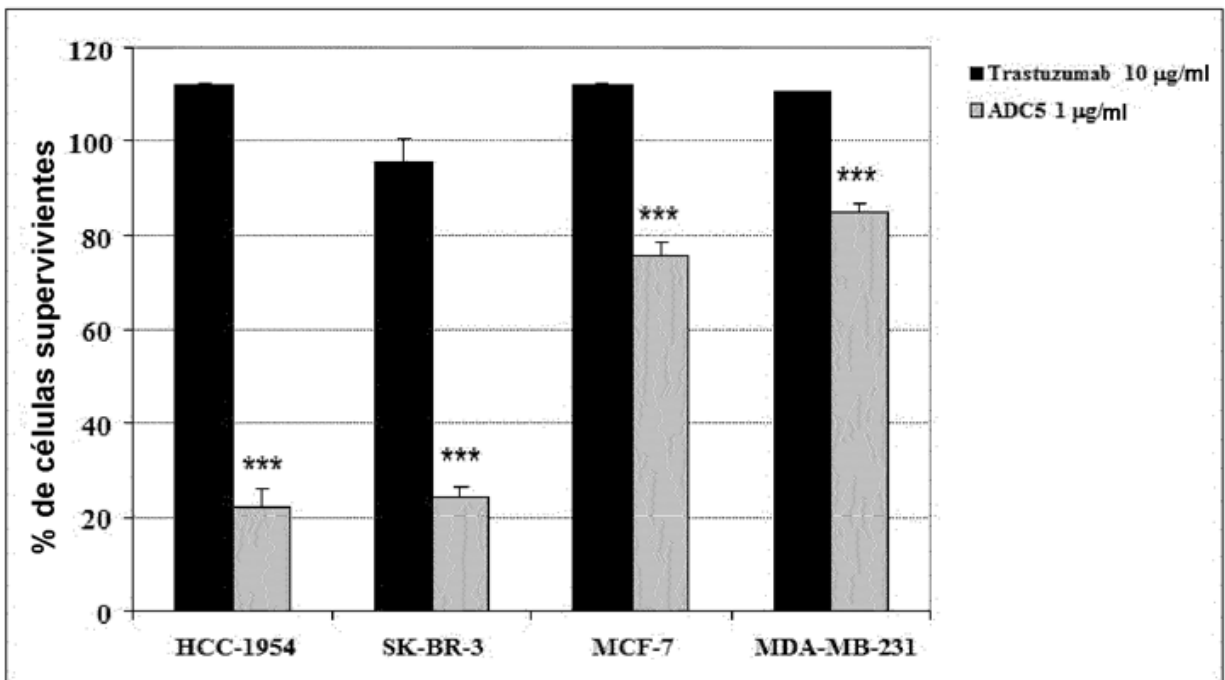
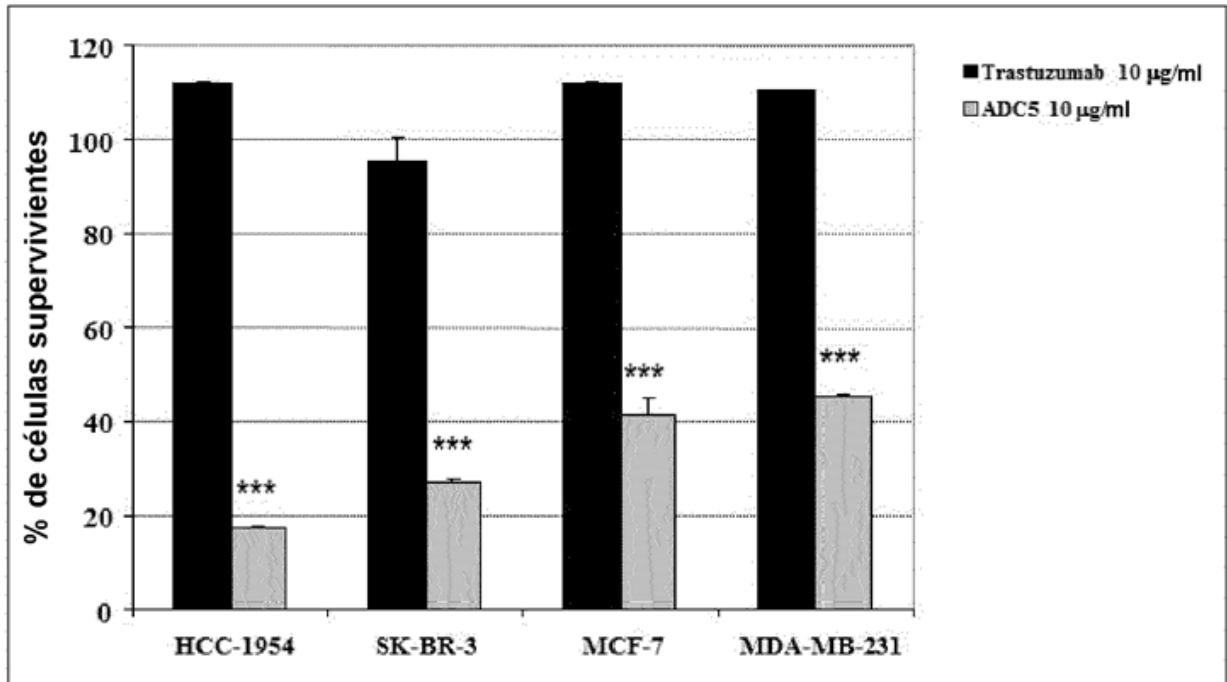


Figura 11

Figura 12



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\*  $p < 0,001$

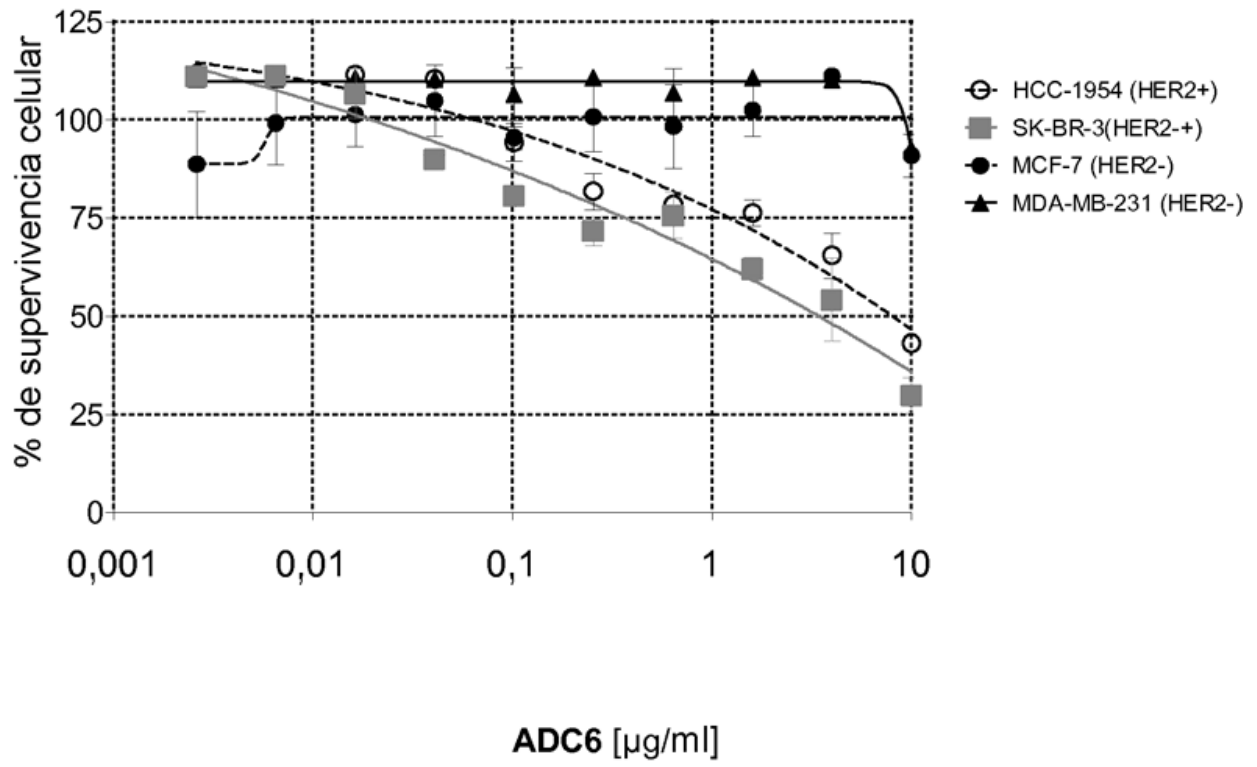
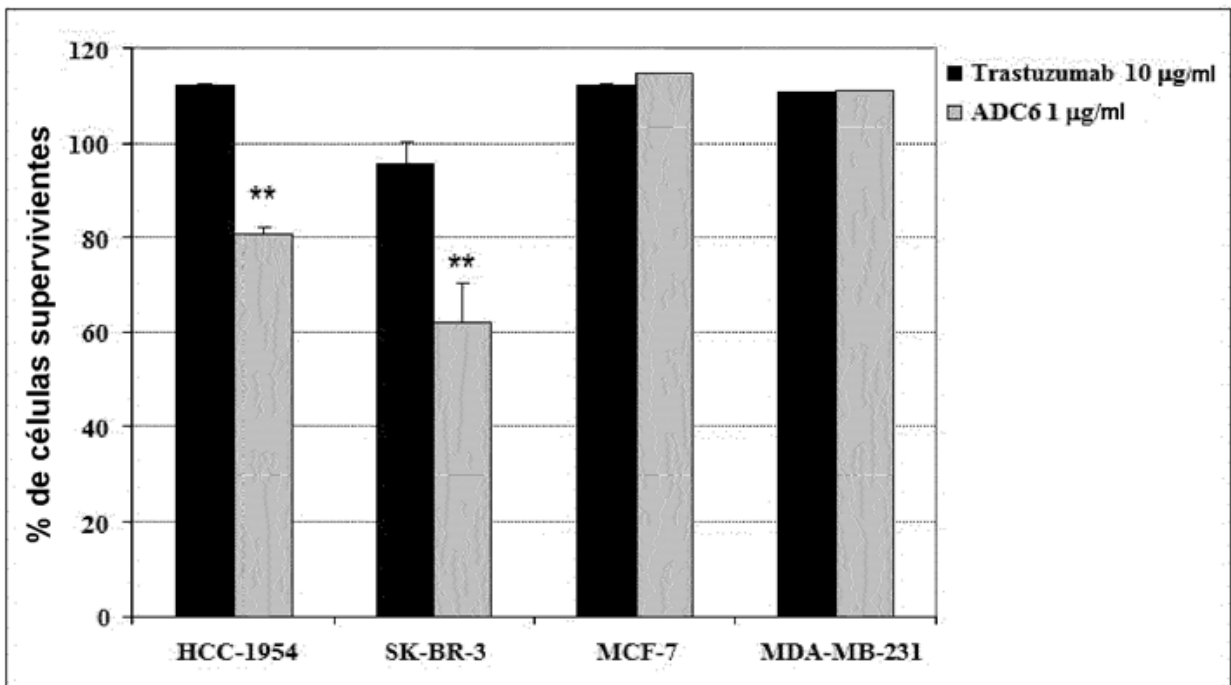
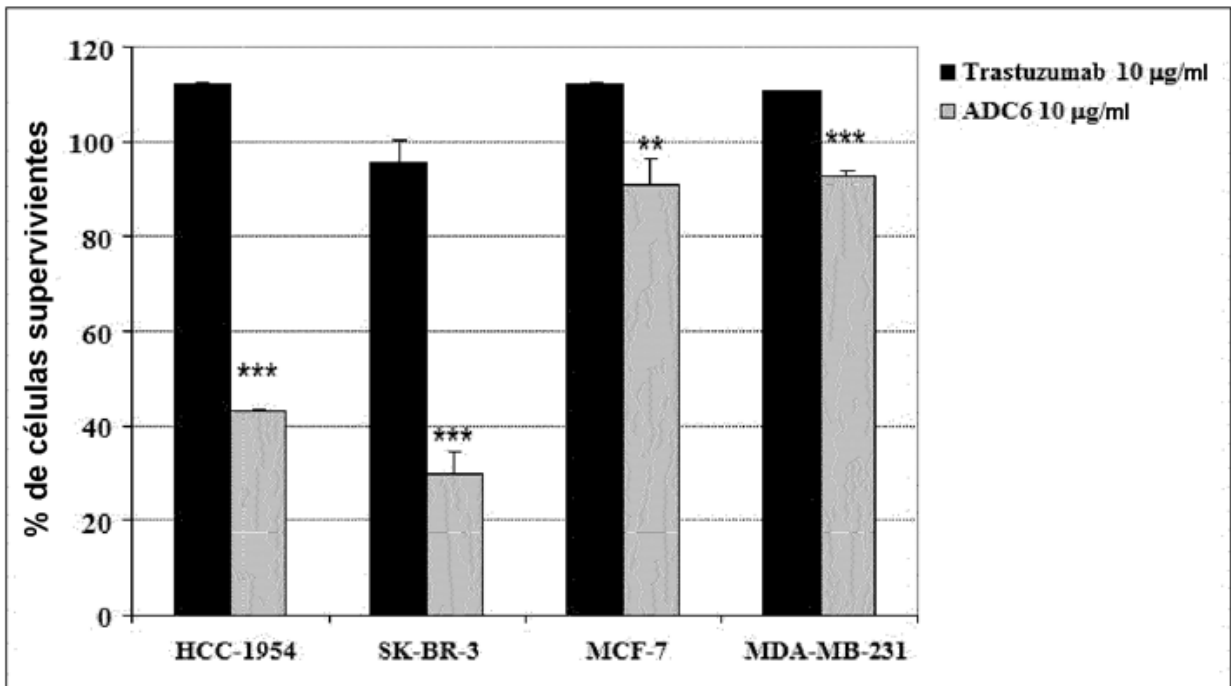


Figura 13

Figura 14



Significación estadística (prueba de la t de Student): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

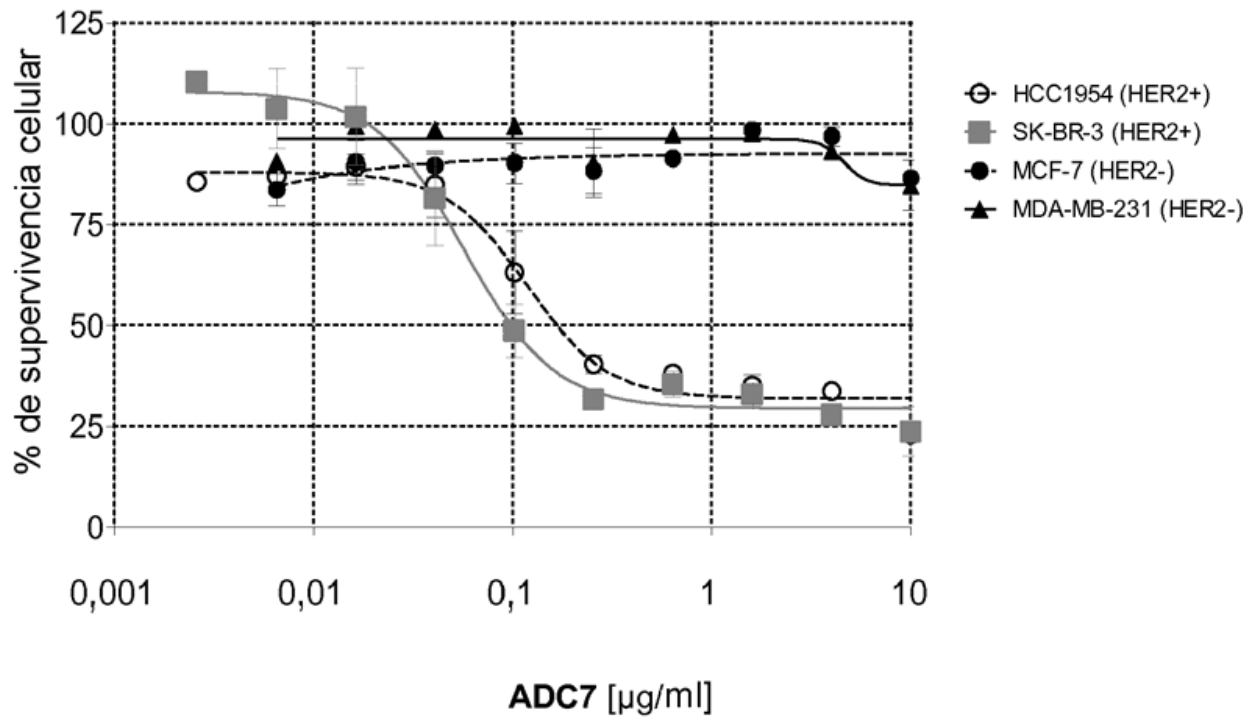
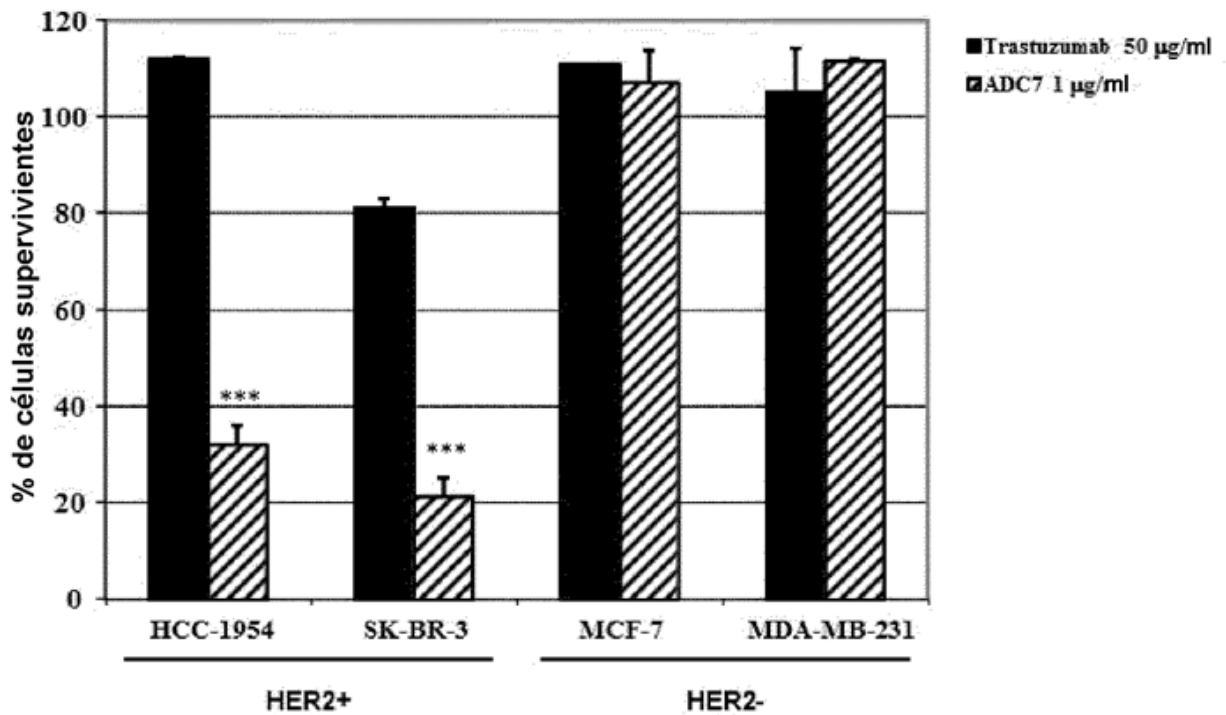
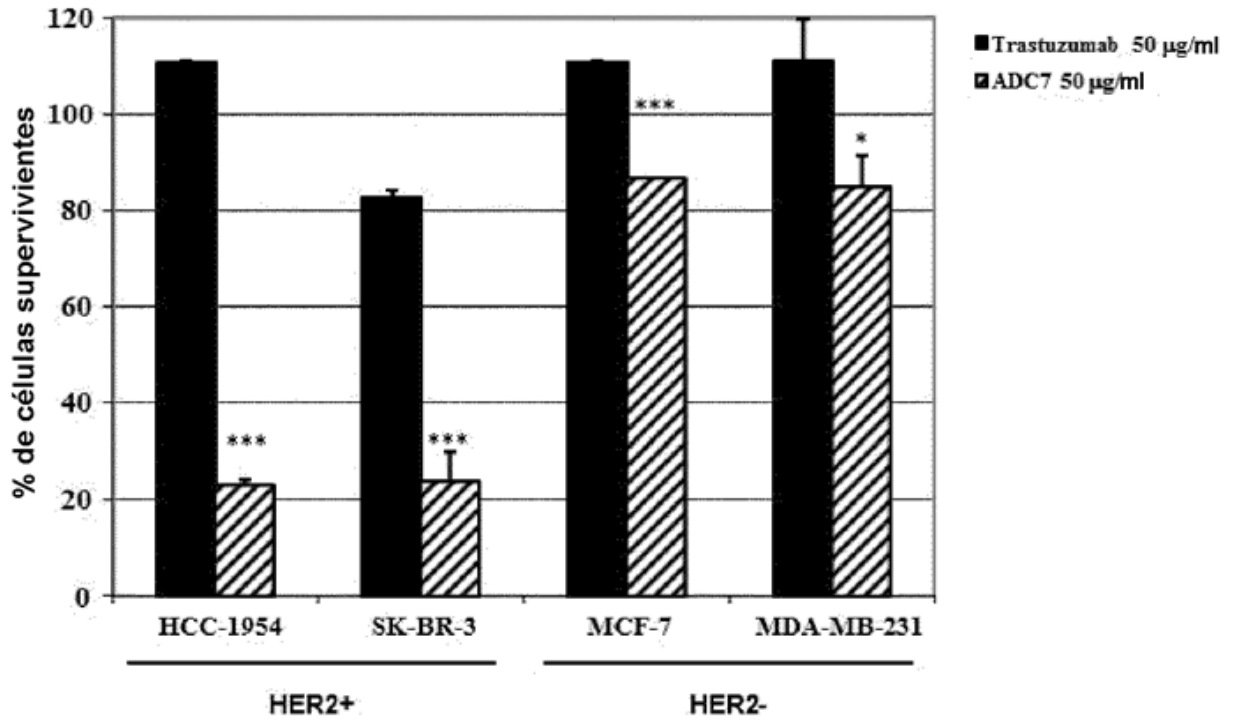


Figura 15

Figura 16



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

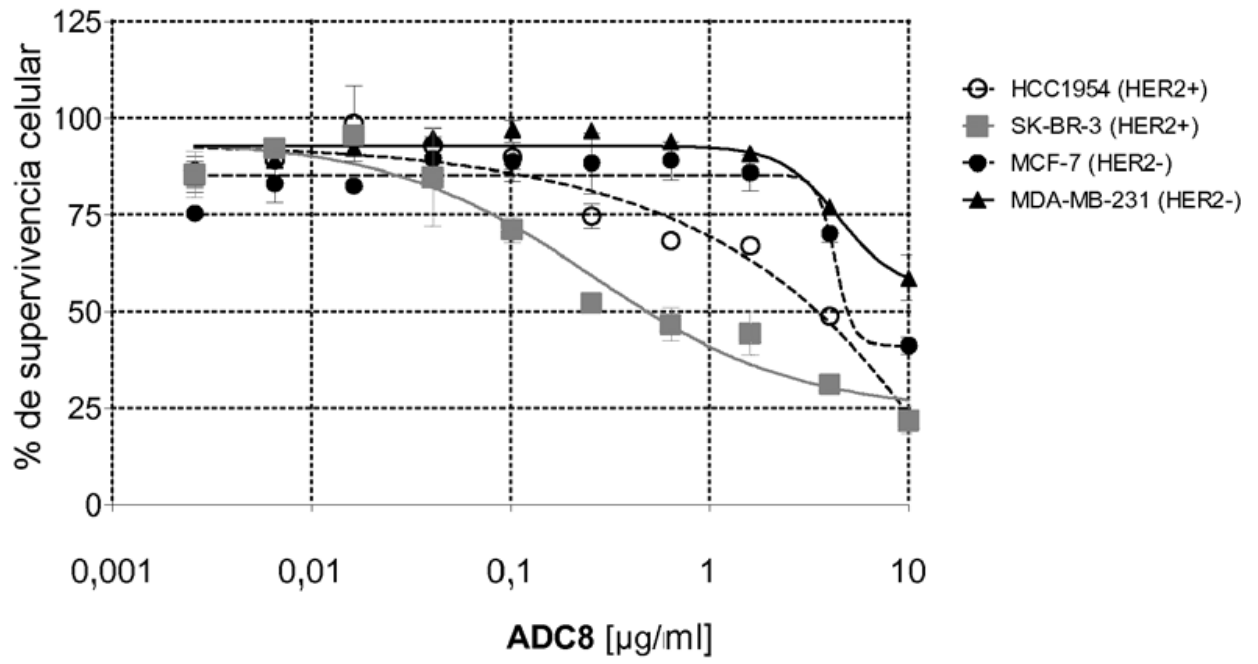
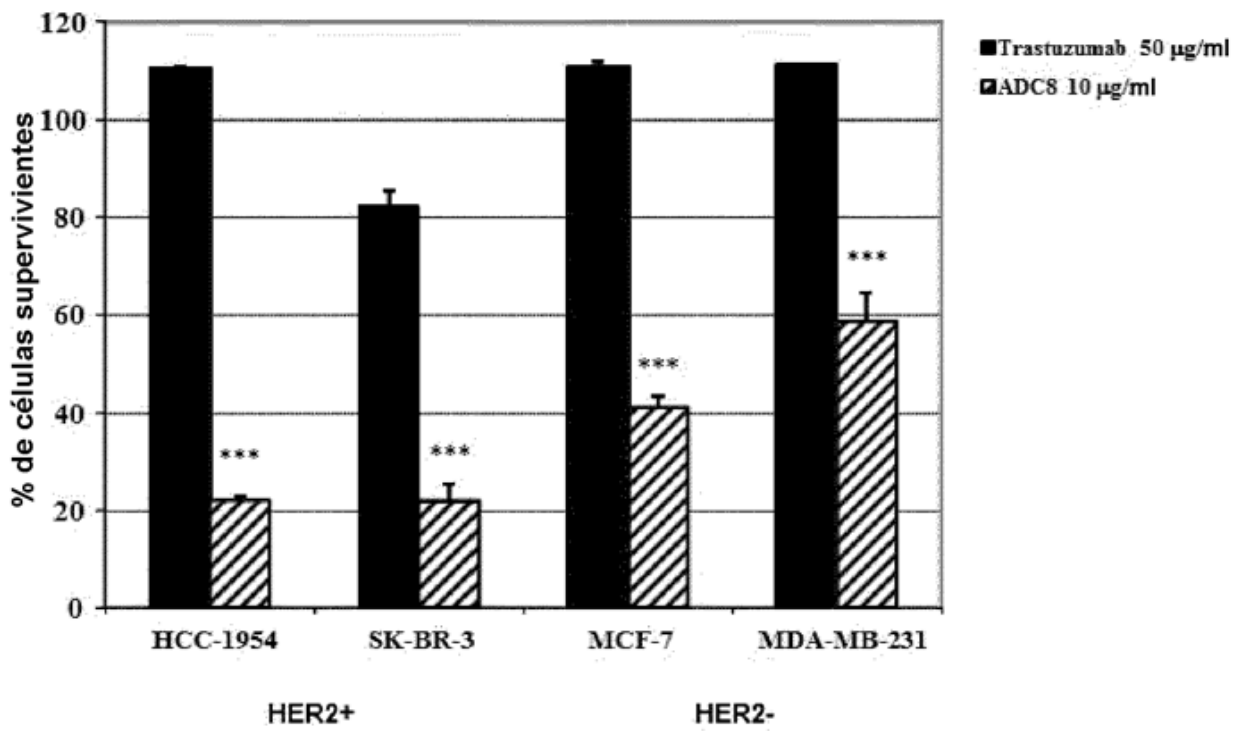
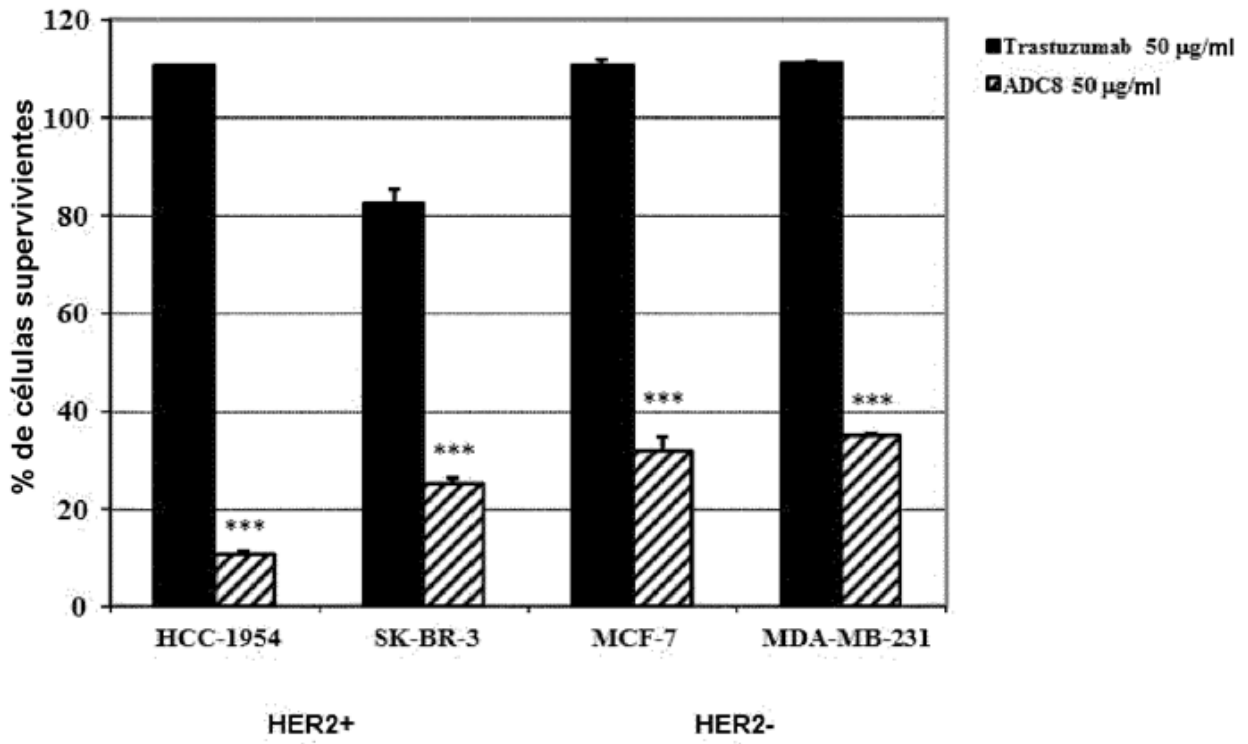


Figura 17



Figura 18



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\* p < 0,001

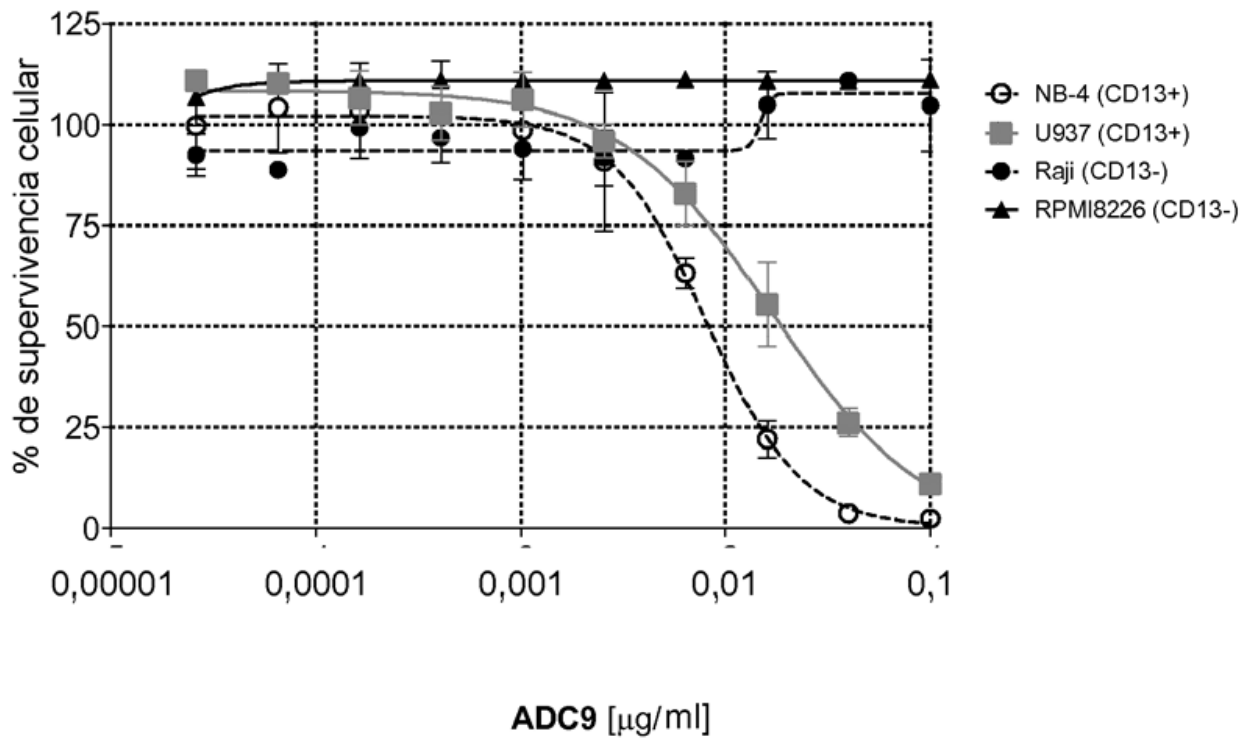
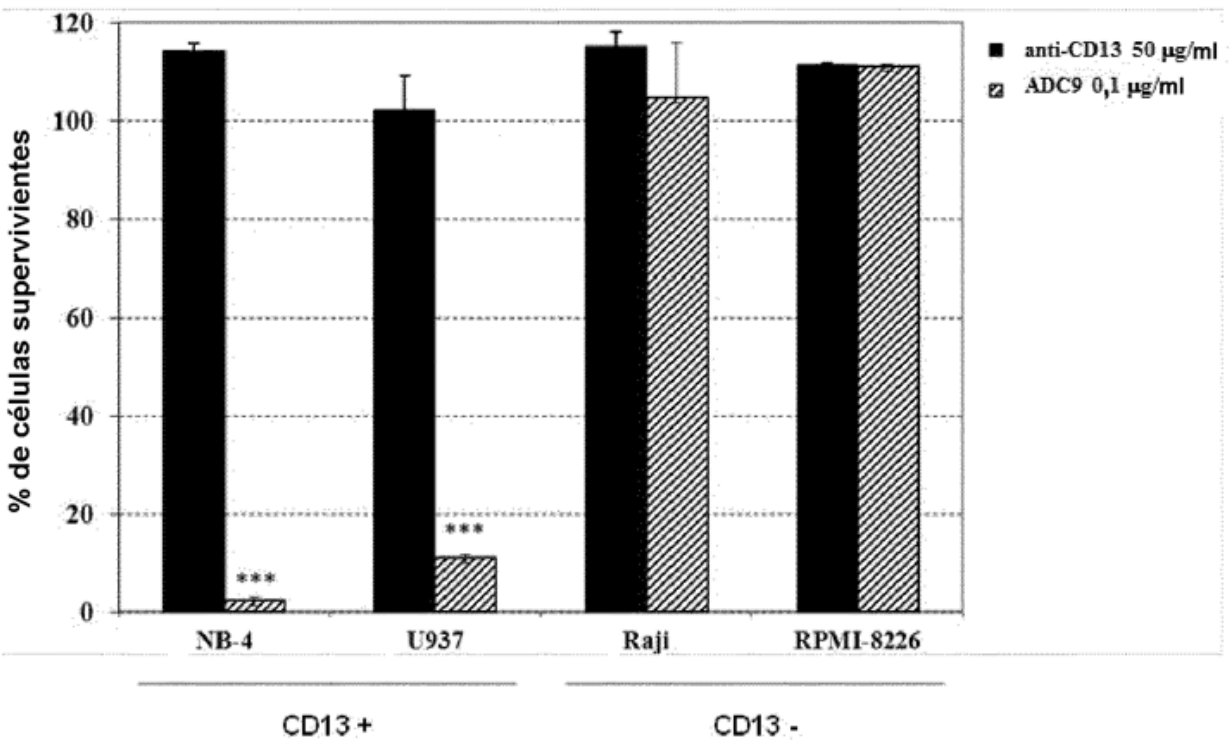
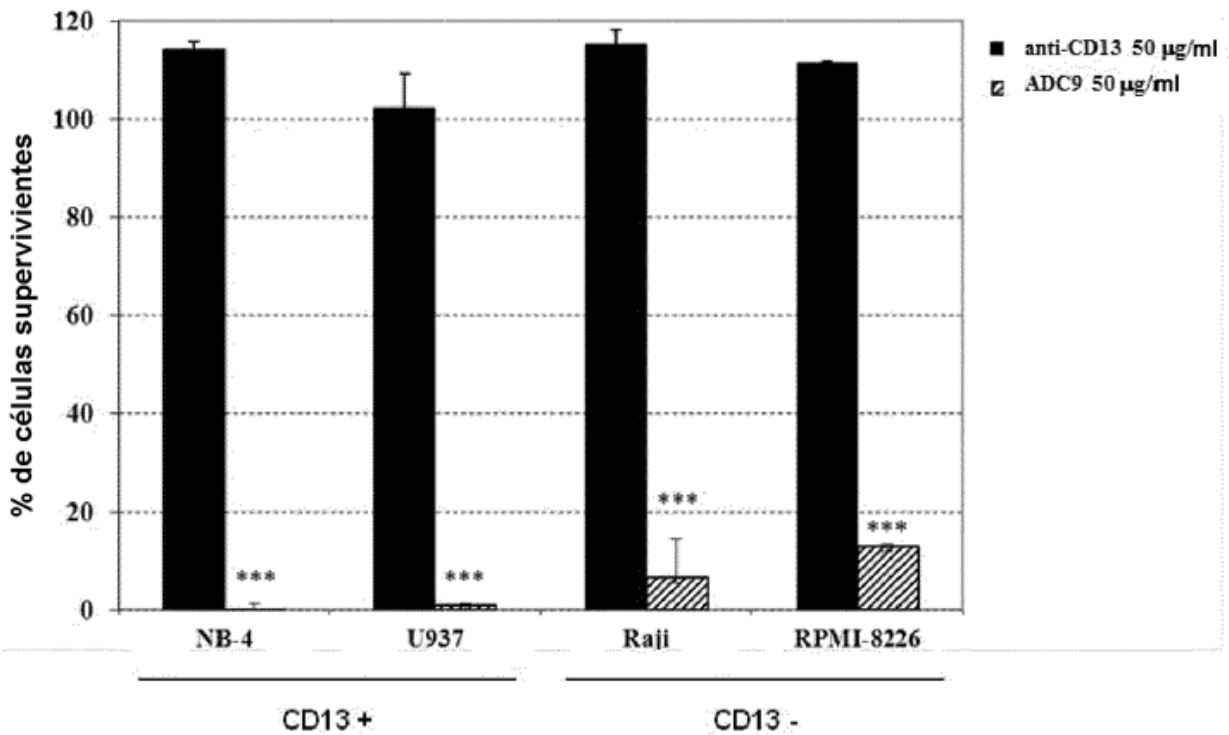


Figura 19

Figura 20



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\*  $p < 0,001$

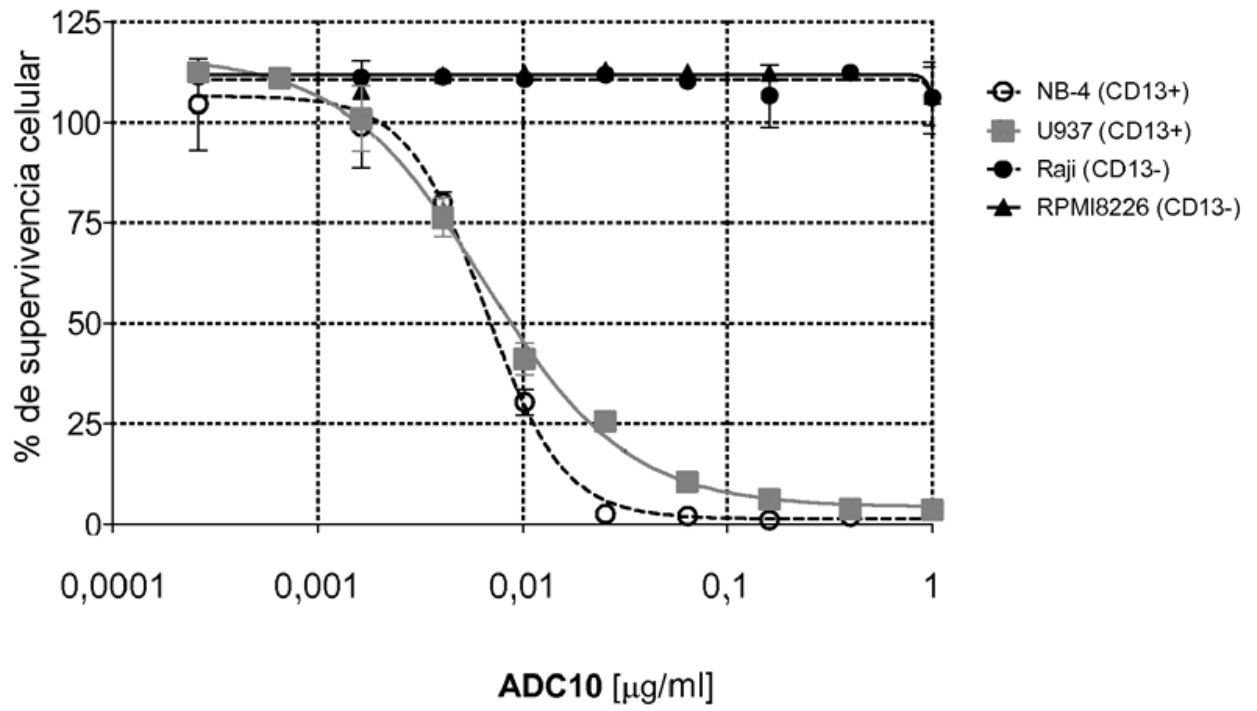
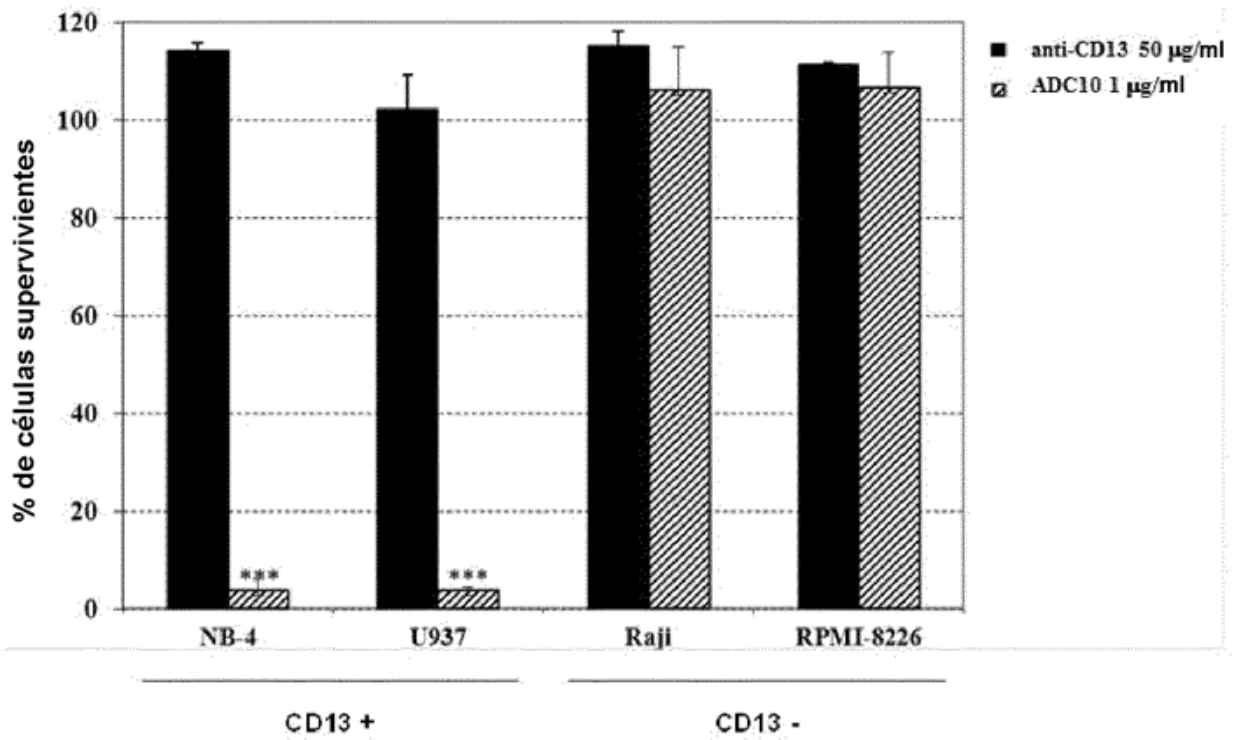
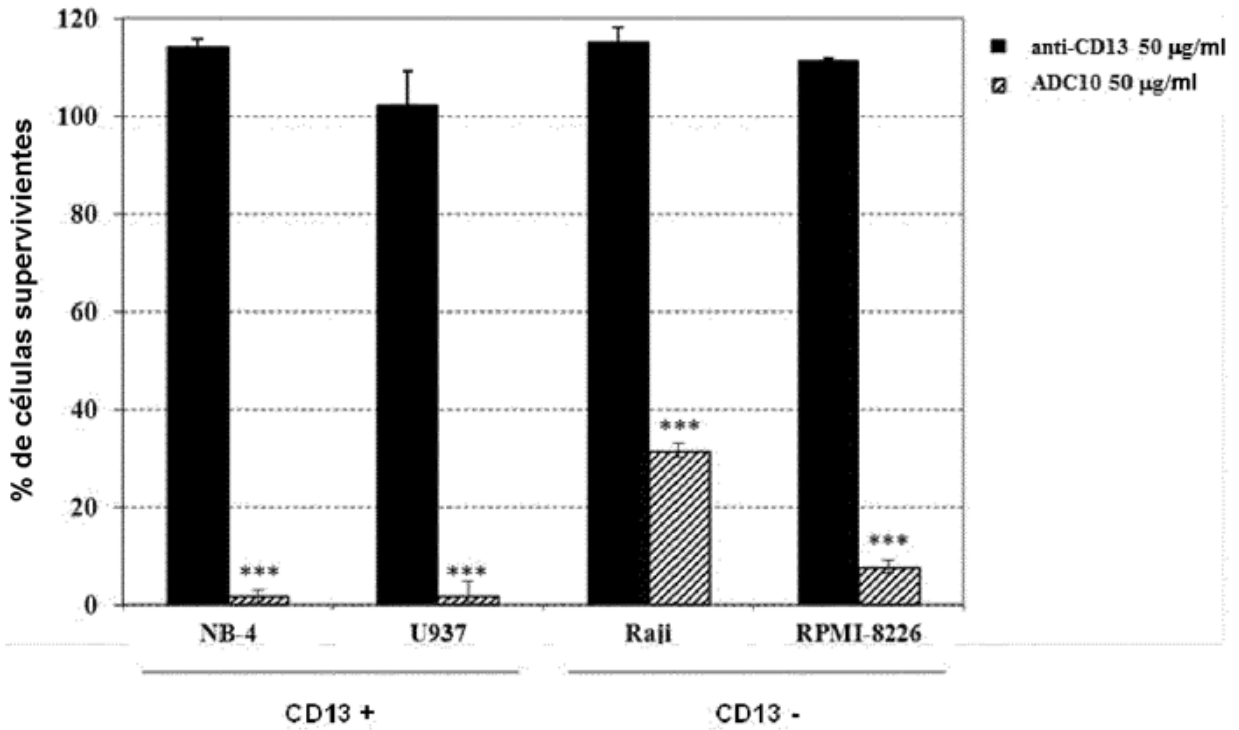


Figura 21

Figura 22



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\* p < 0,001

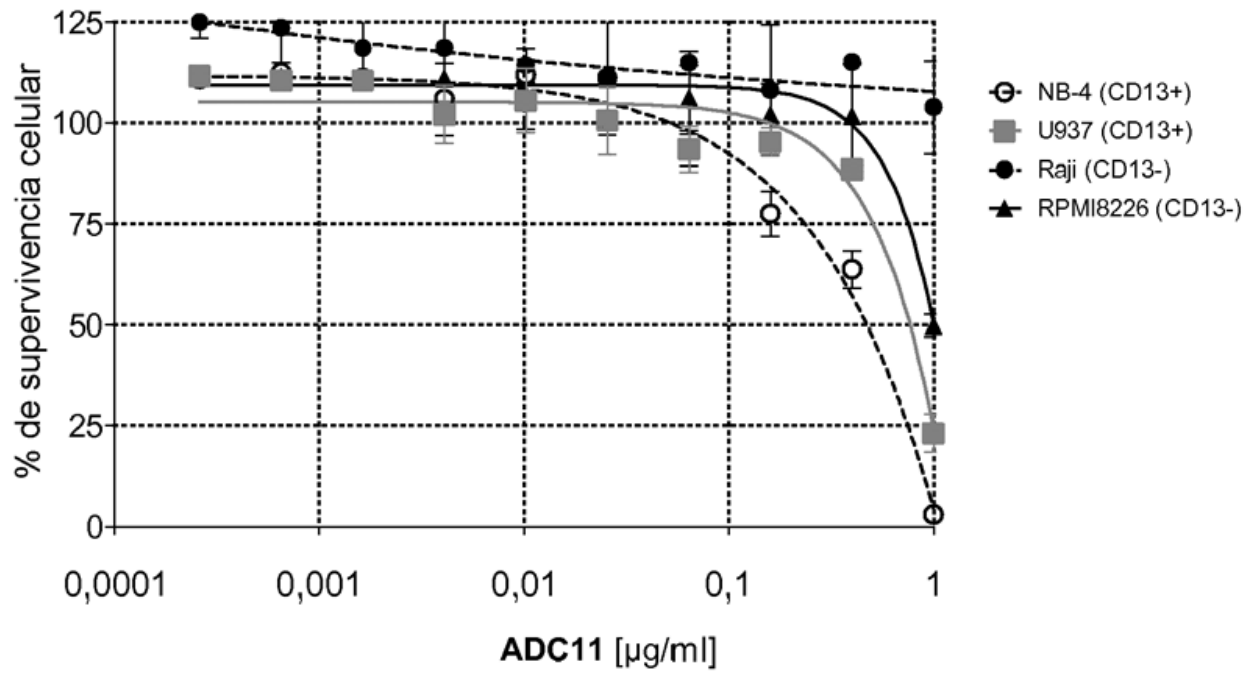
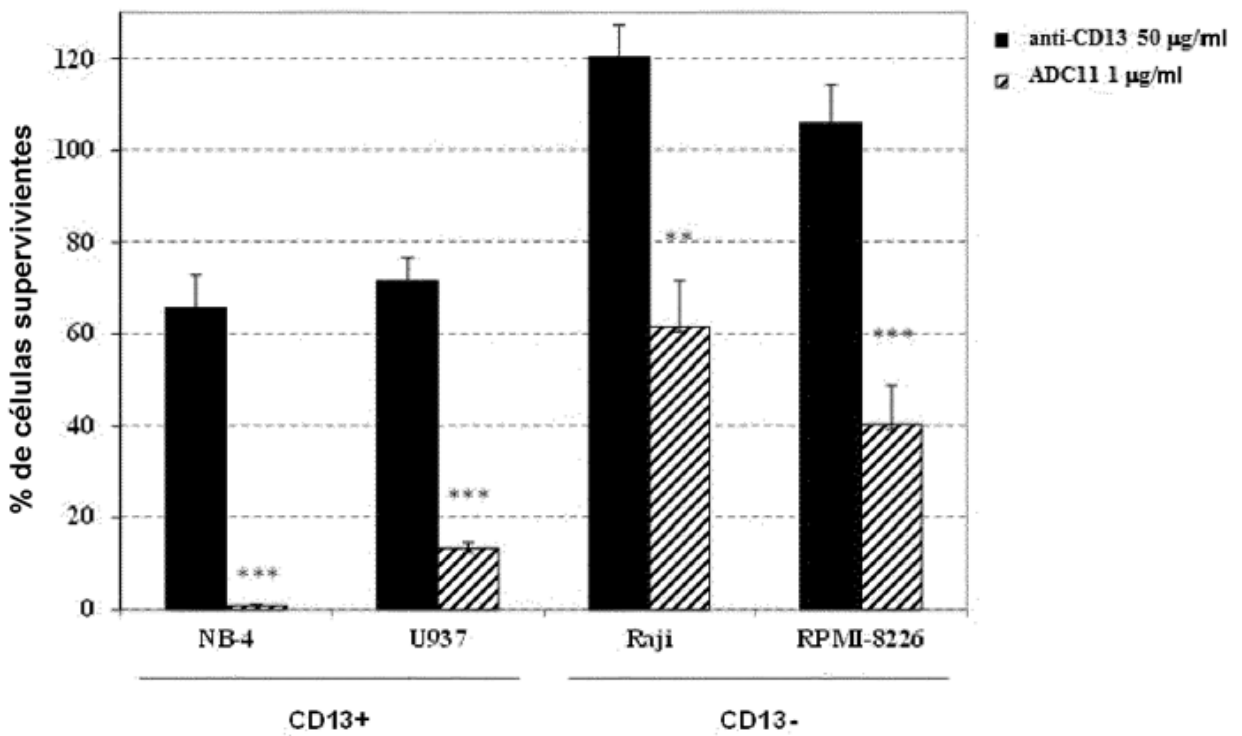
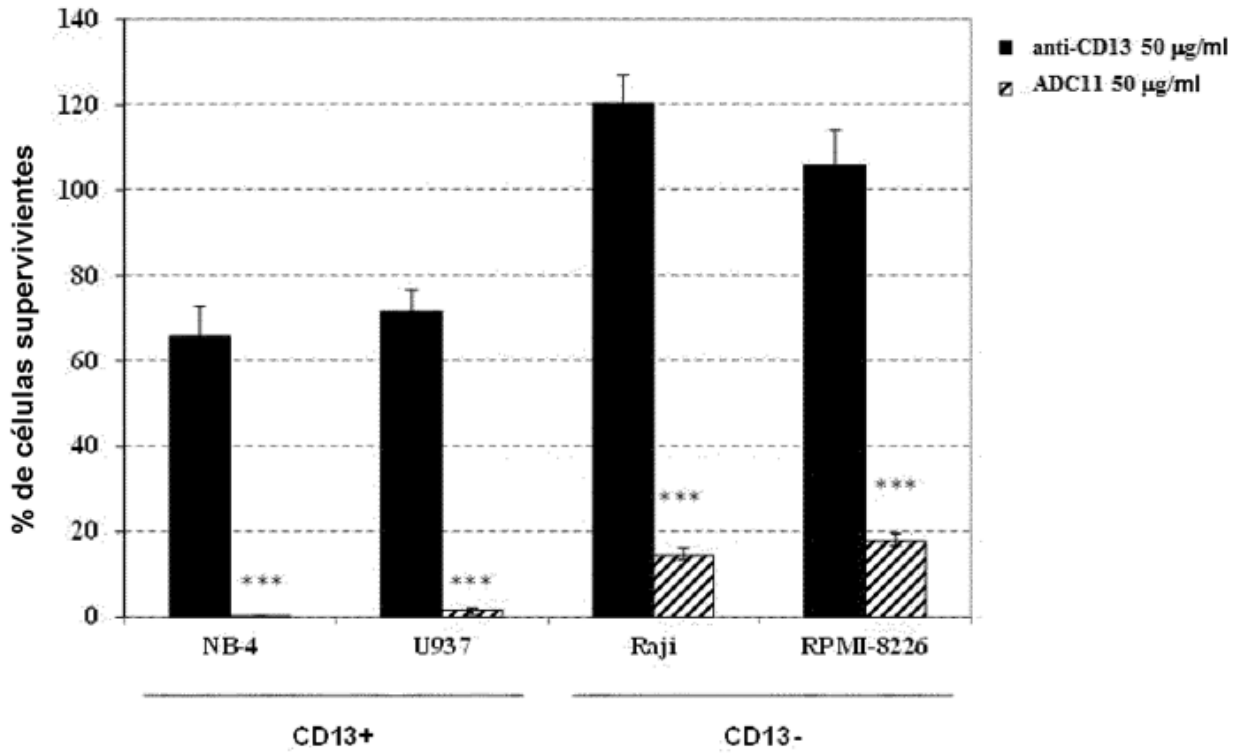


Figura 23

Figura 24



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

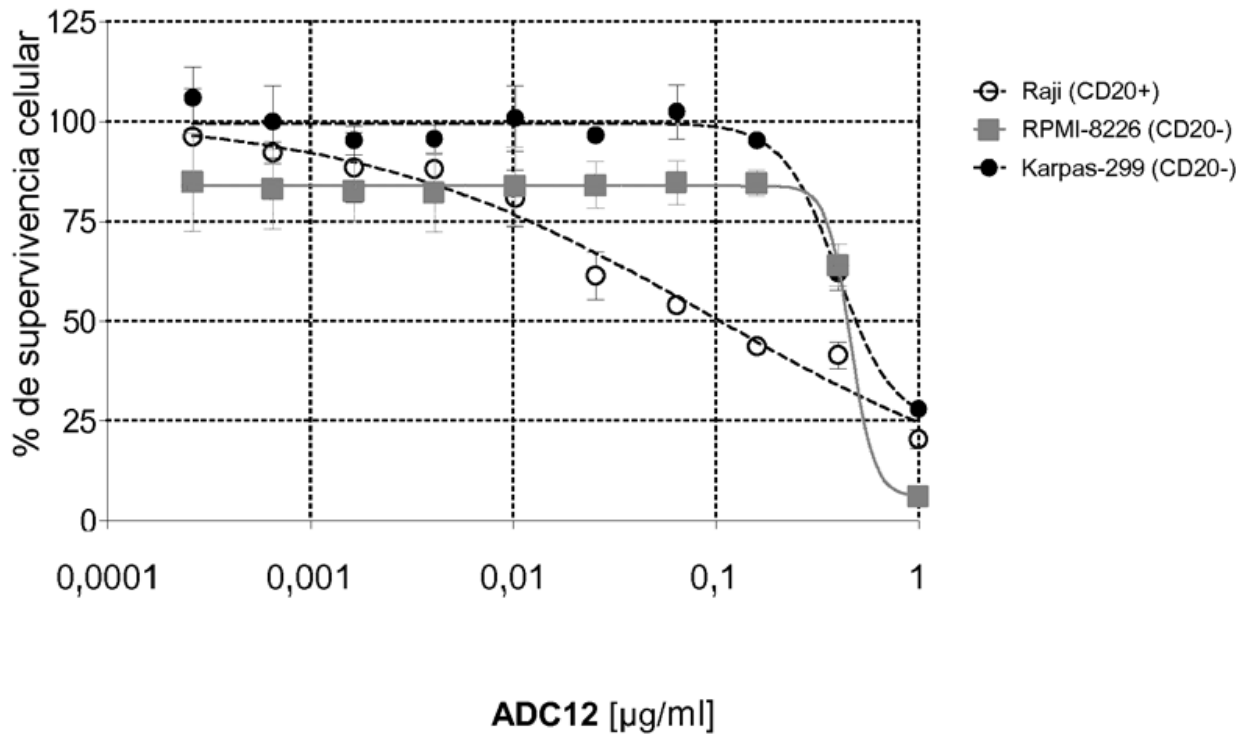
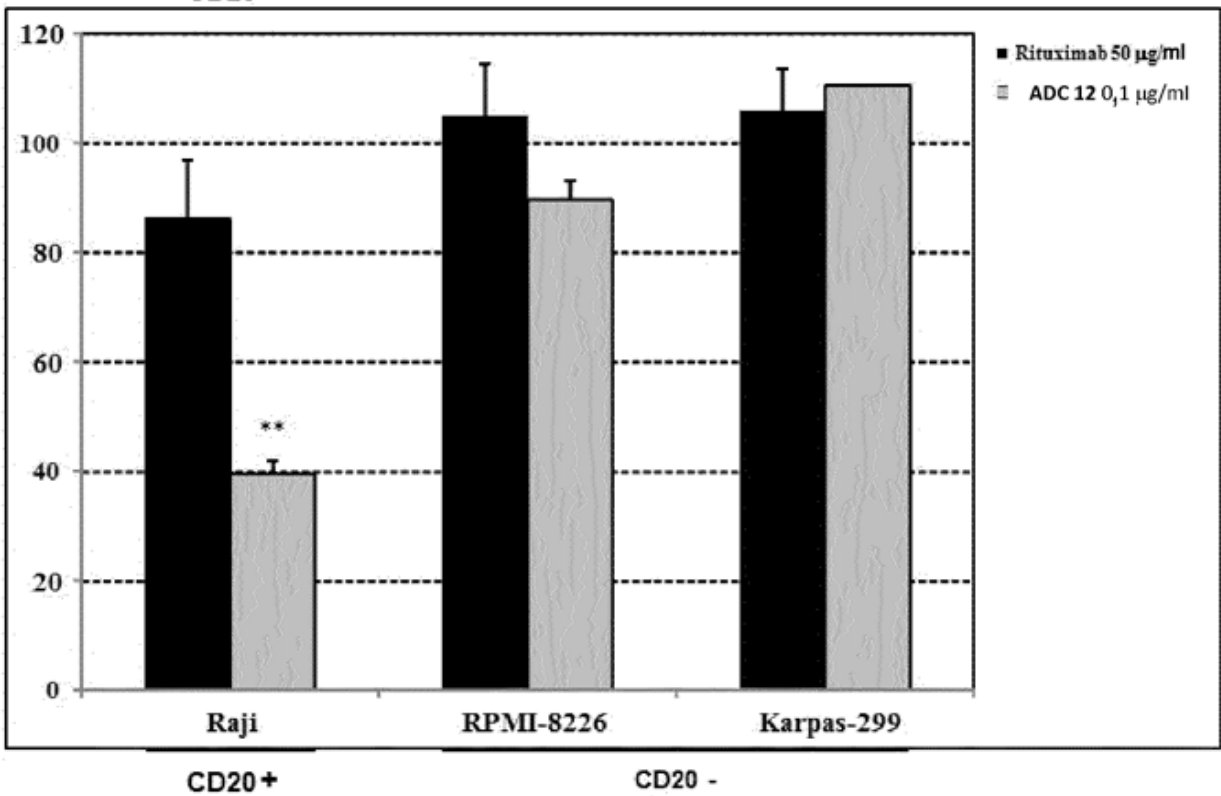
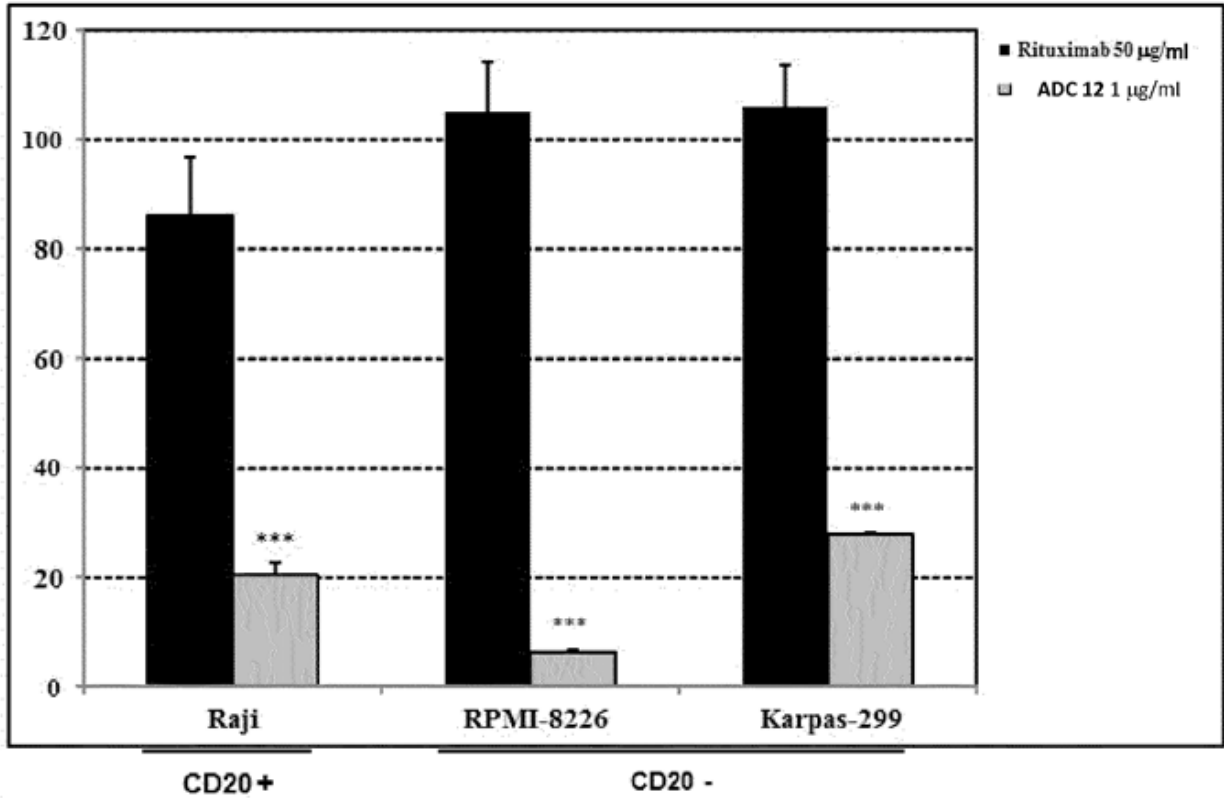


Figura 25



Figura 26



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

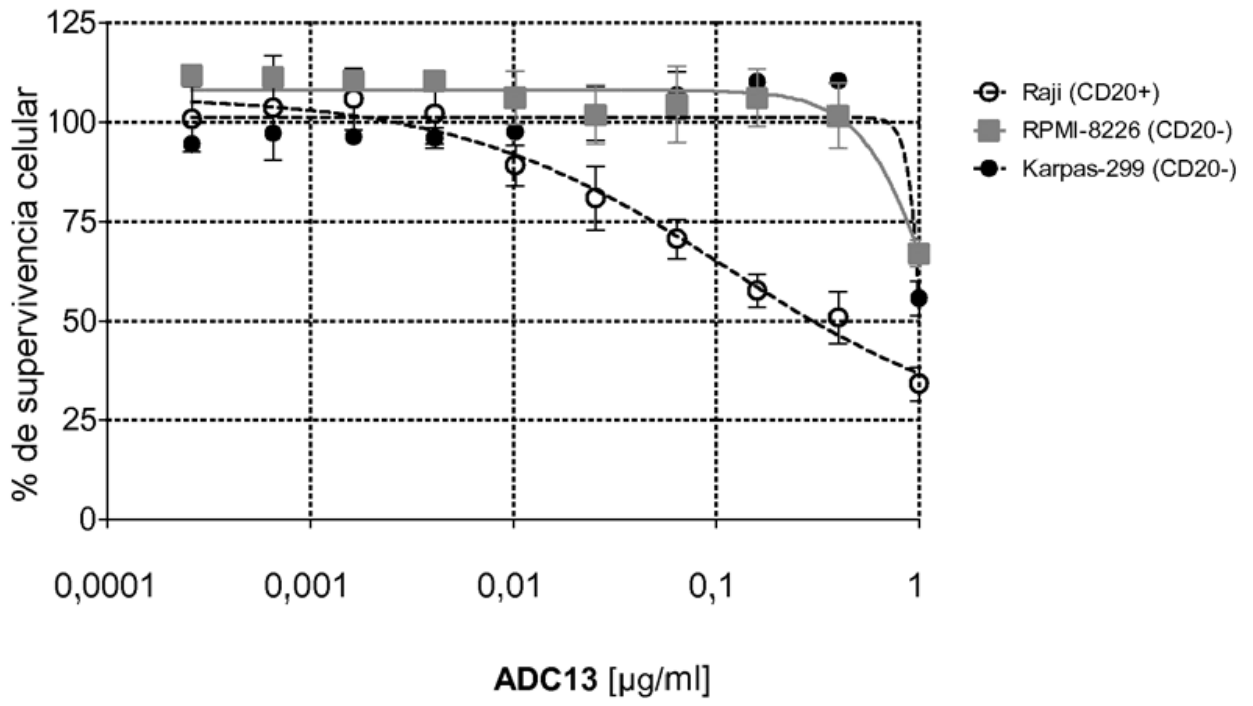
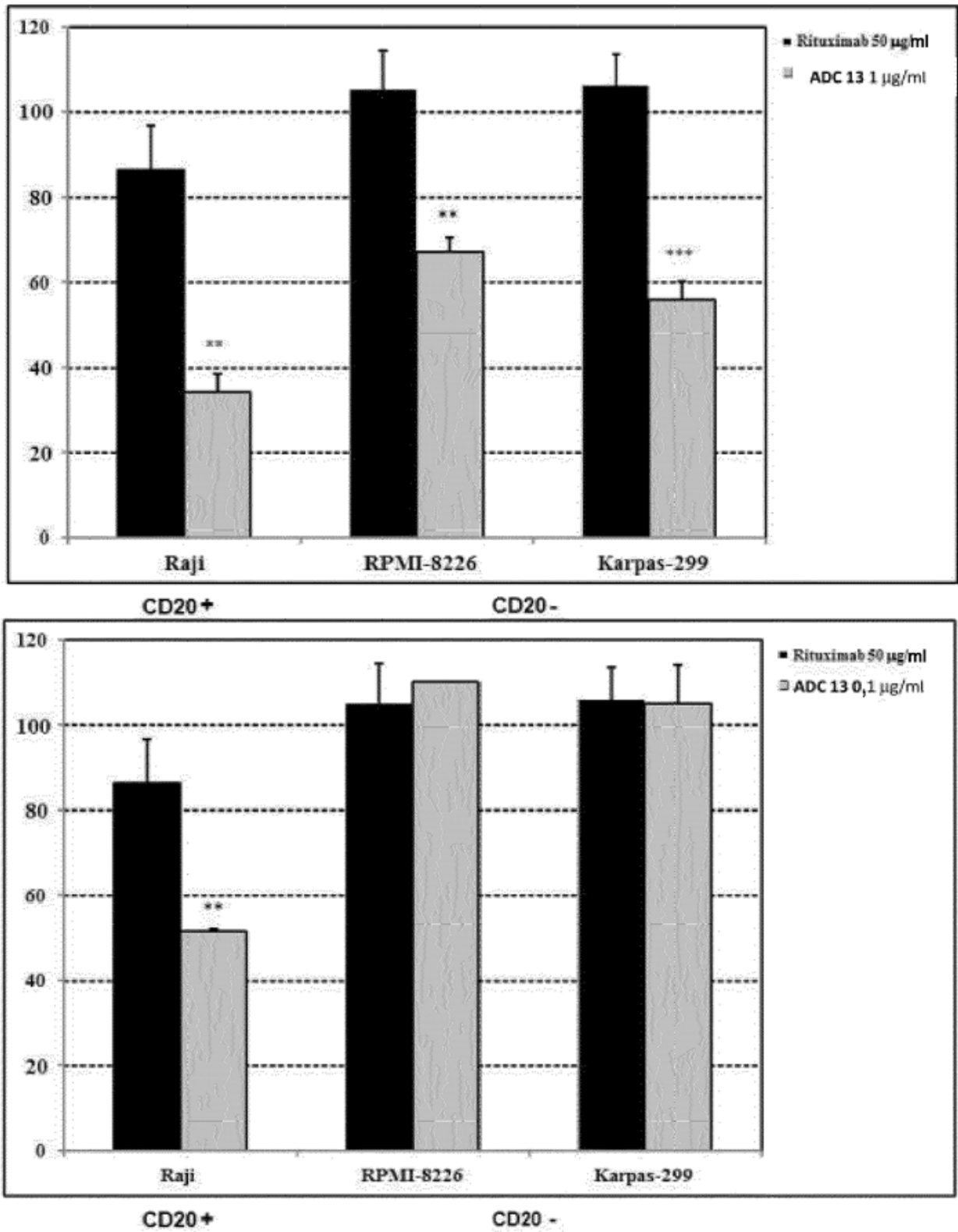


Figura 27

Figura 28



Significación estadística (prueba de la t de Student): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

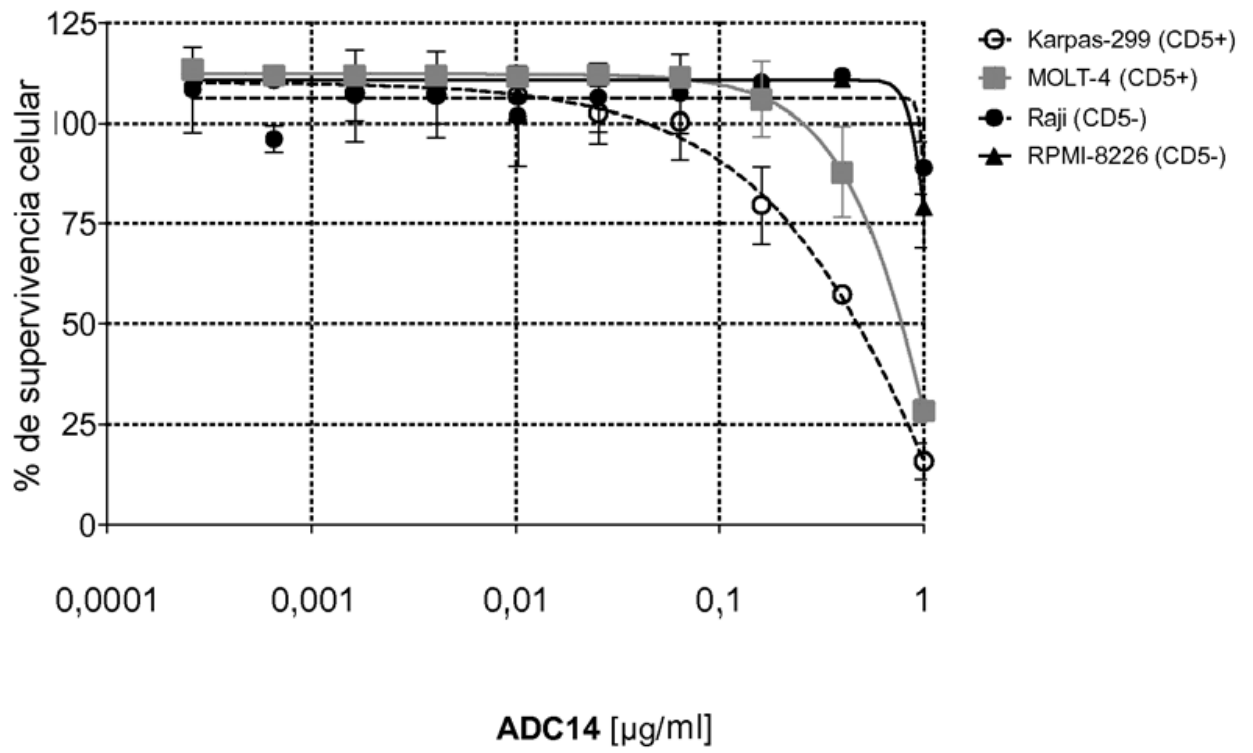
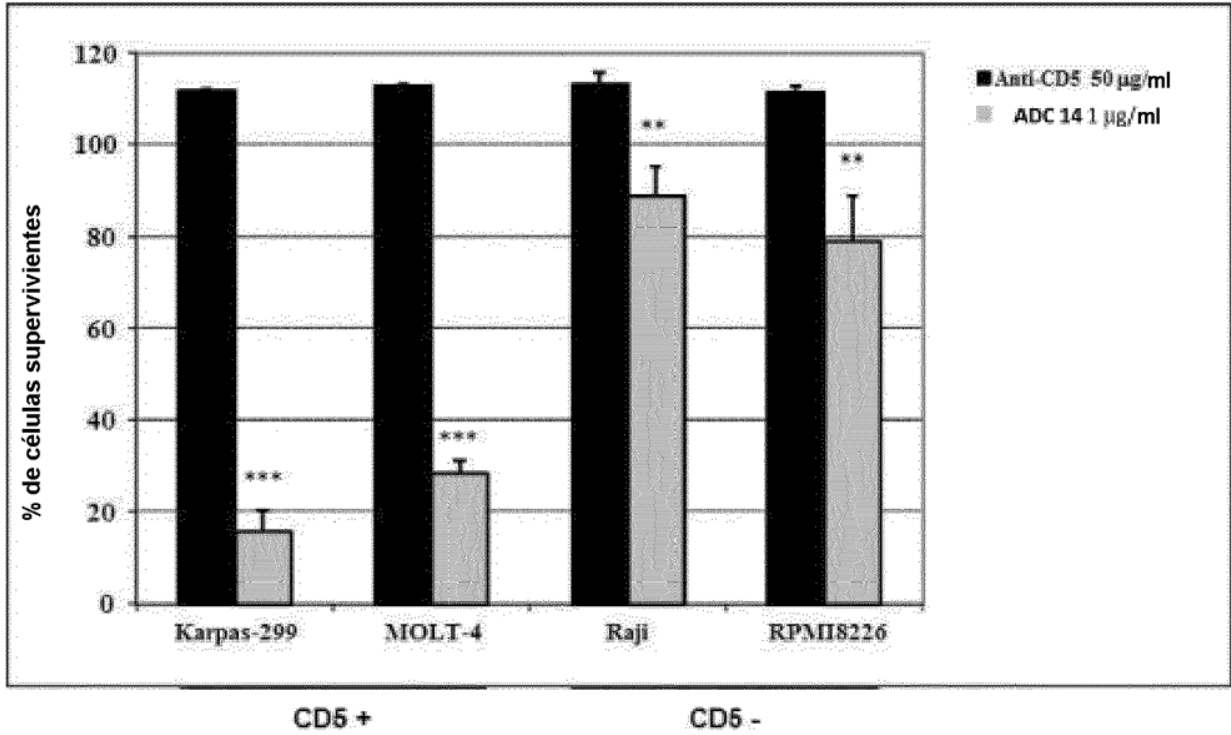


Figura 29

Figura 30



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

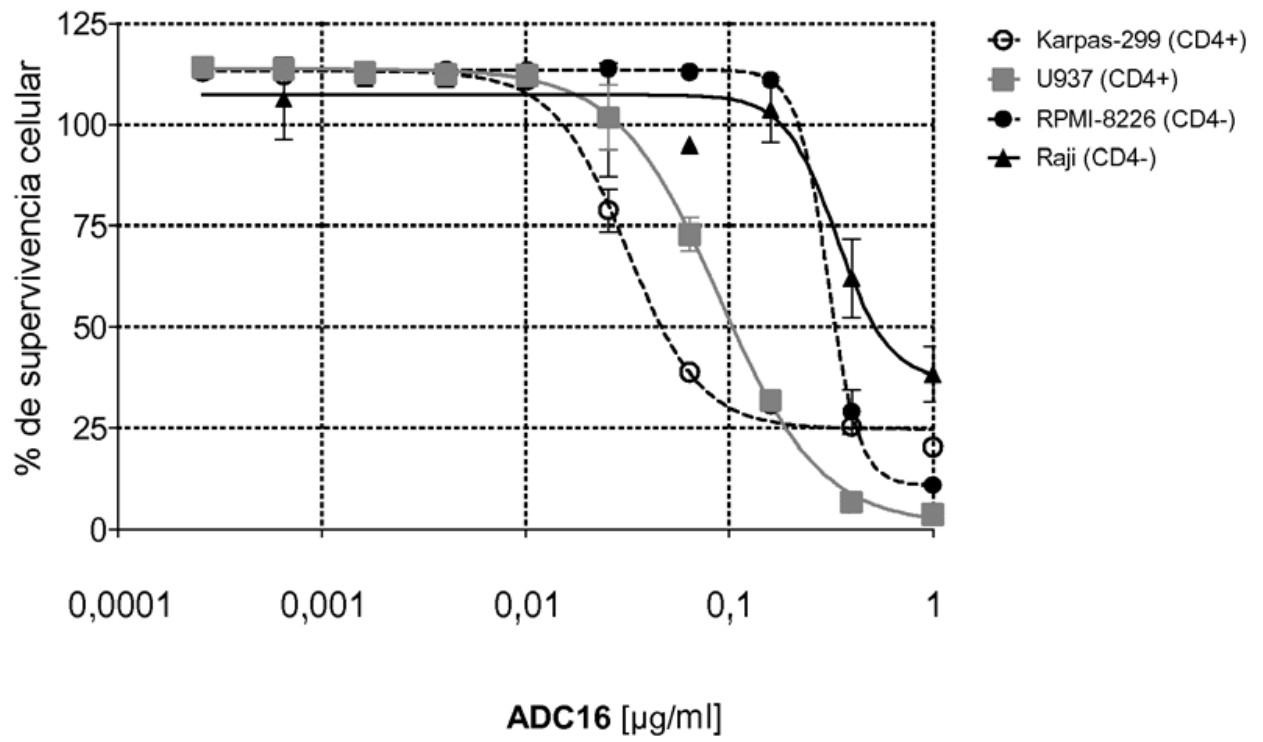
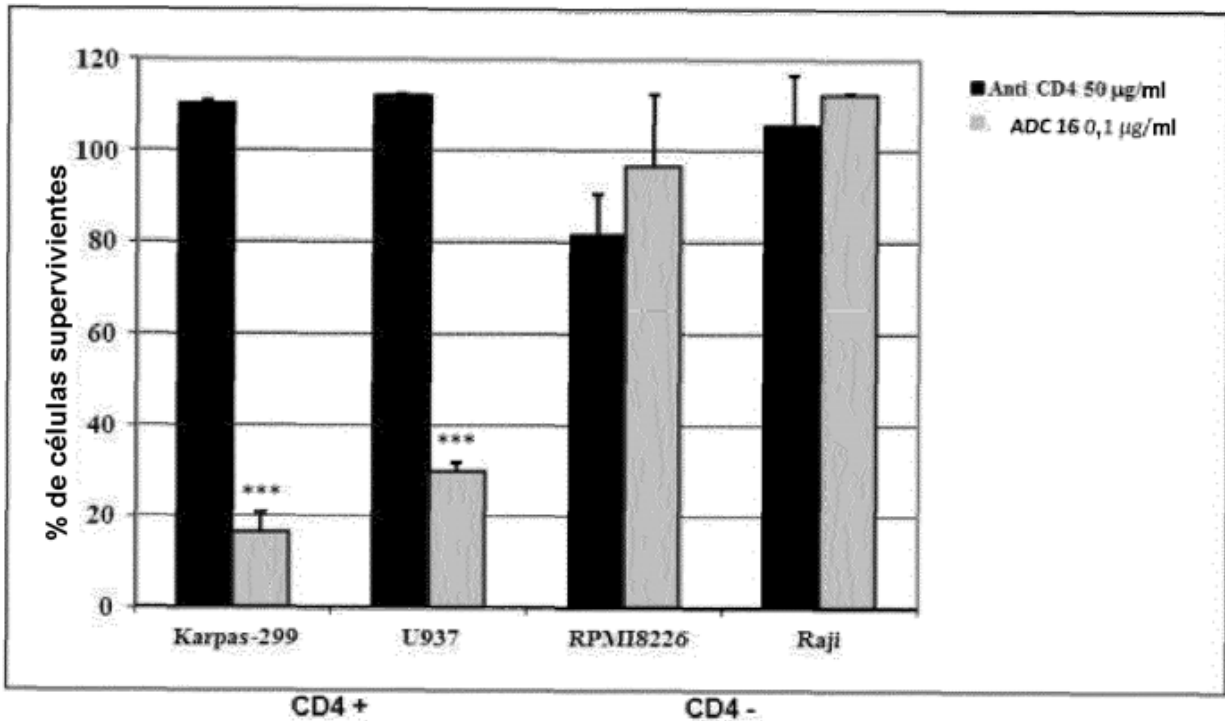
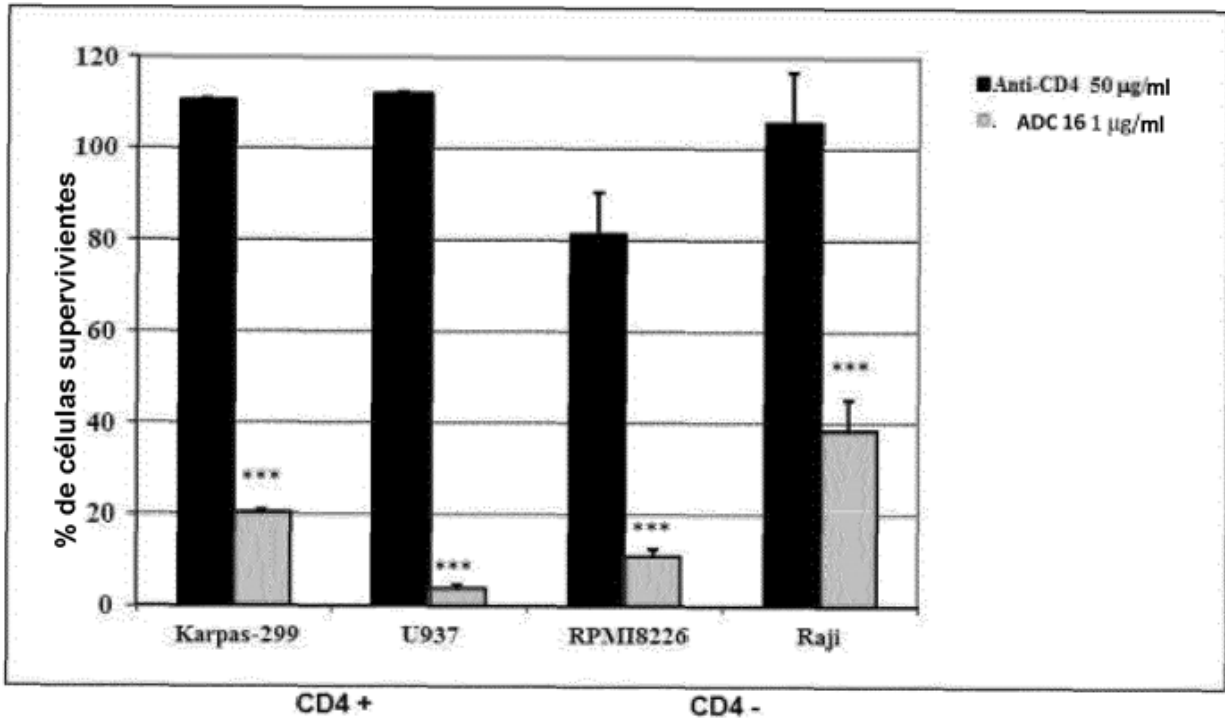


Figura 31

Figura 32



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

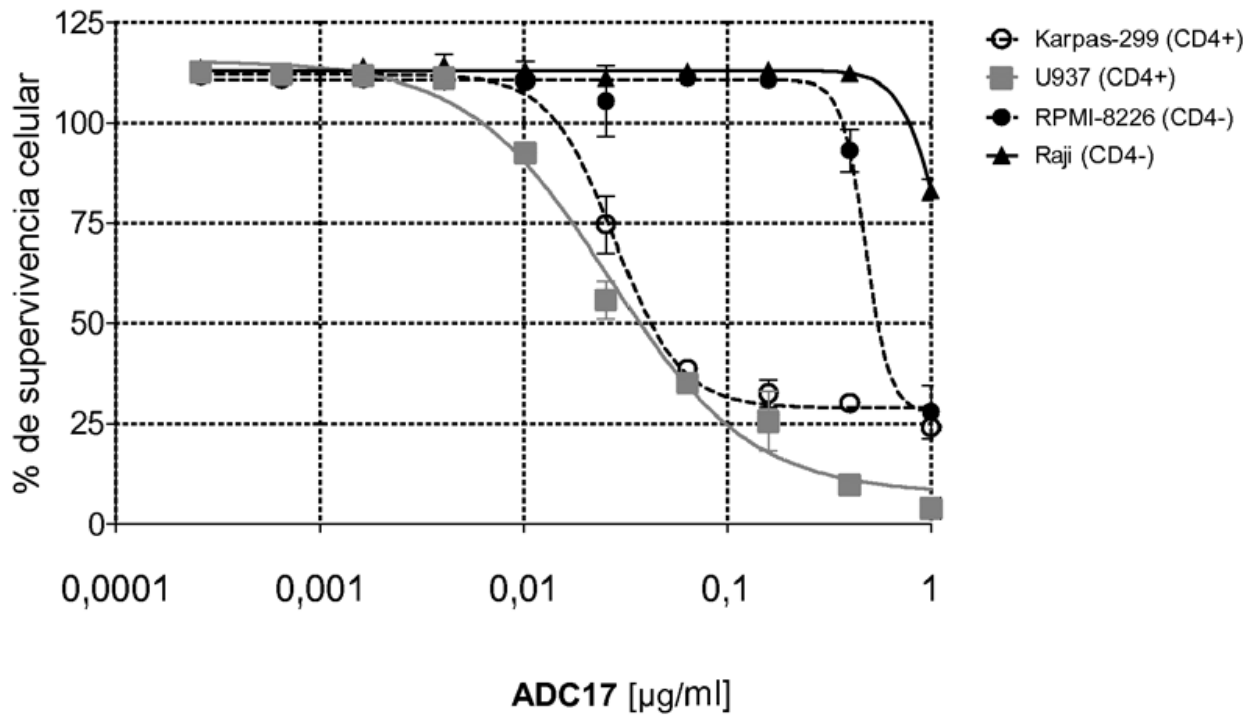
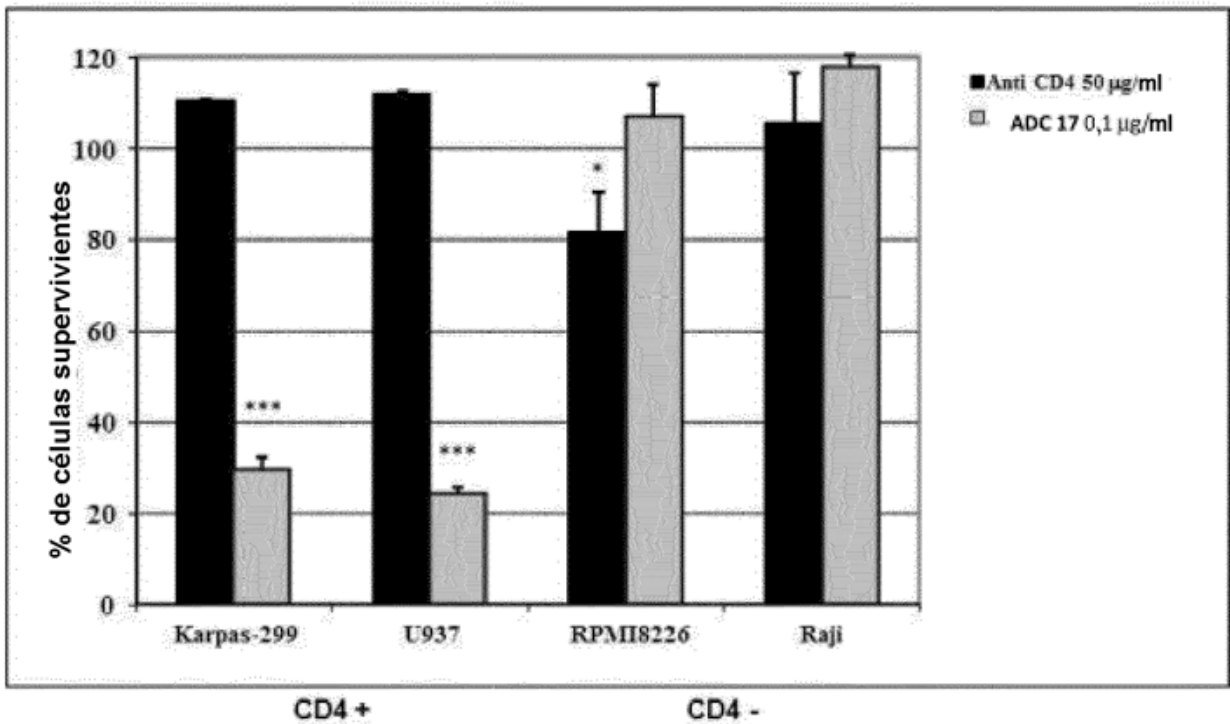
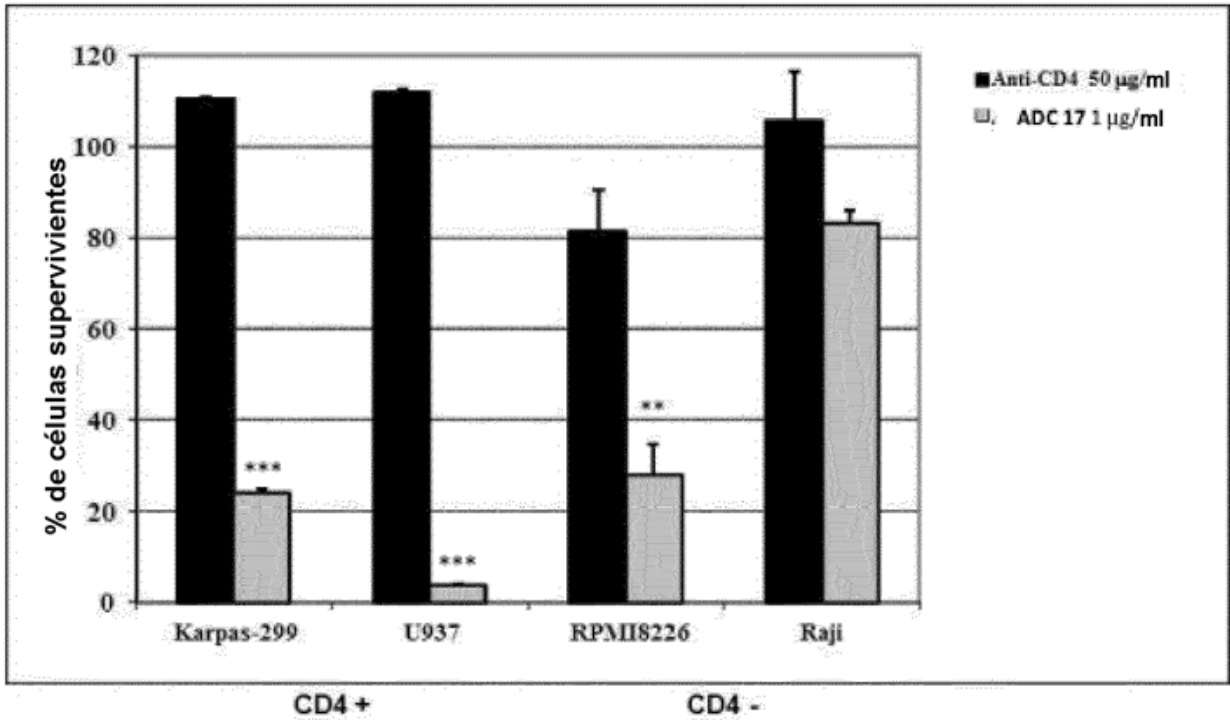


Figura 33



Figura 34



Significación estadística (prueba de la t de Student): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001

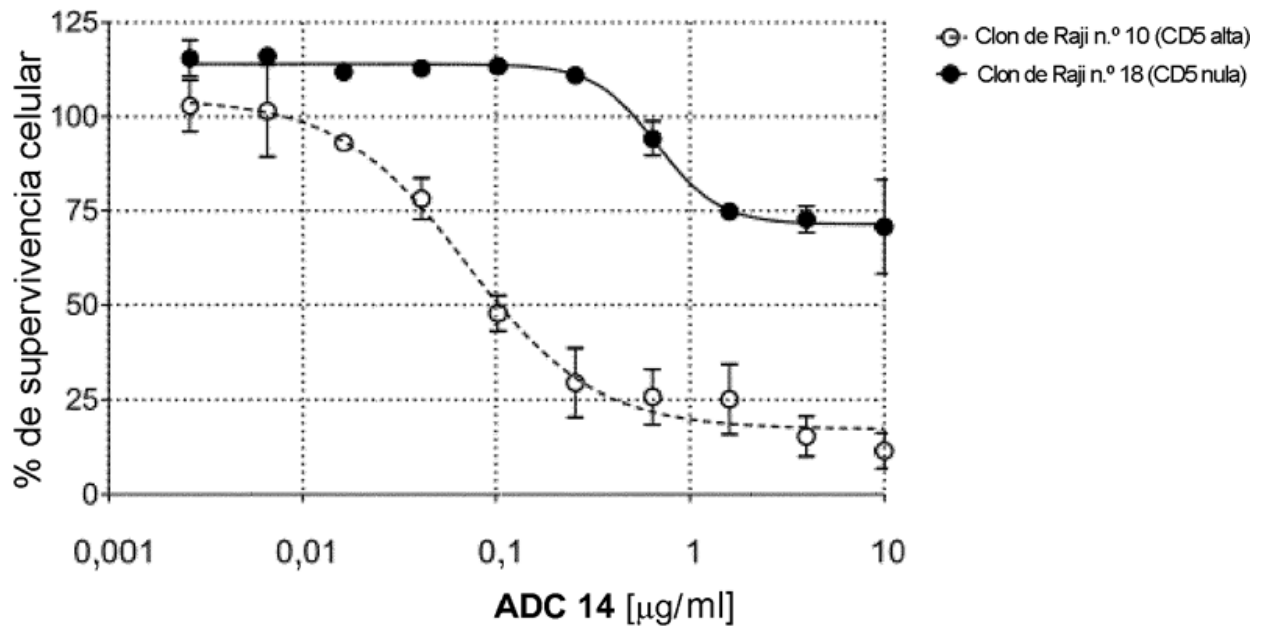
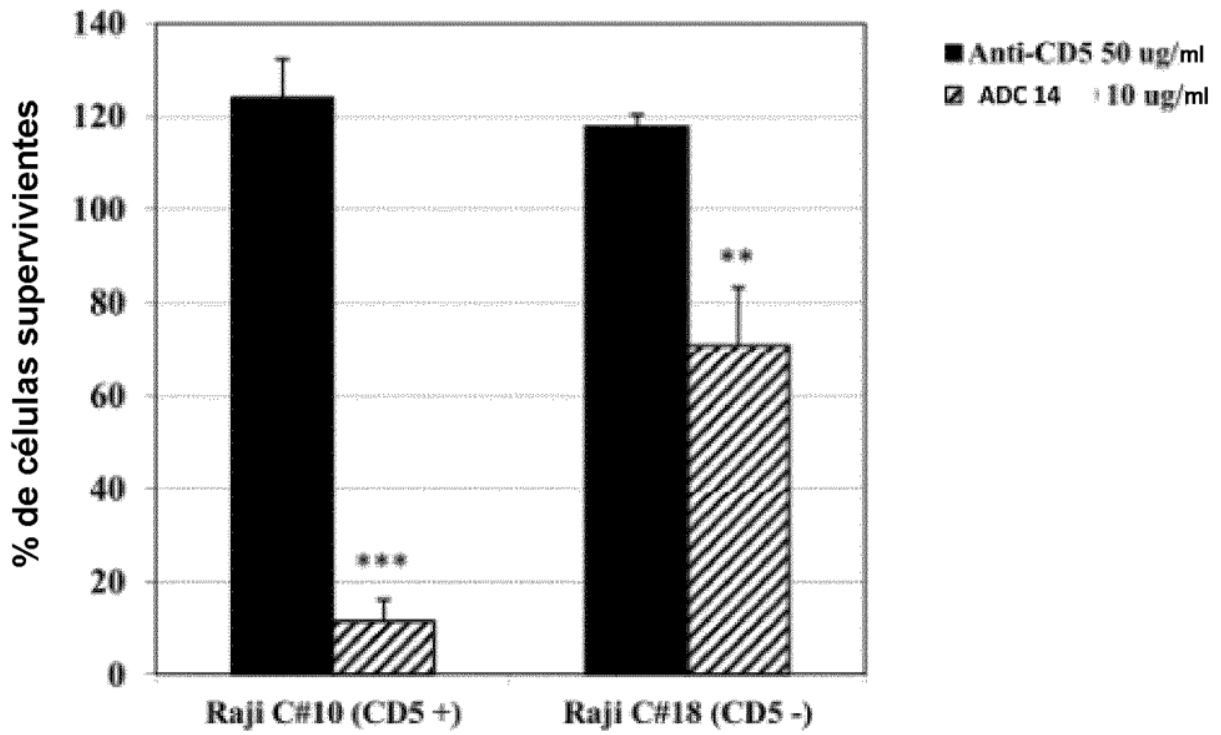


Figura 35

Figura 36



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

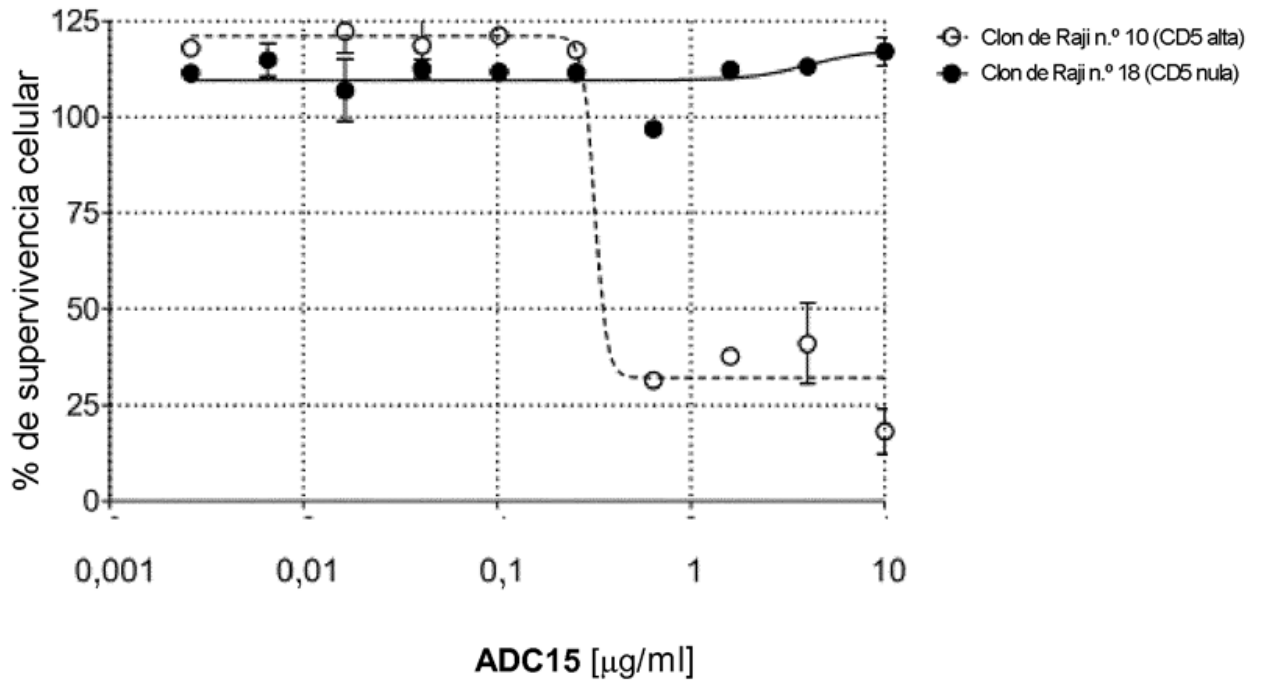
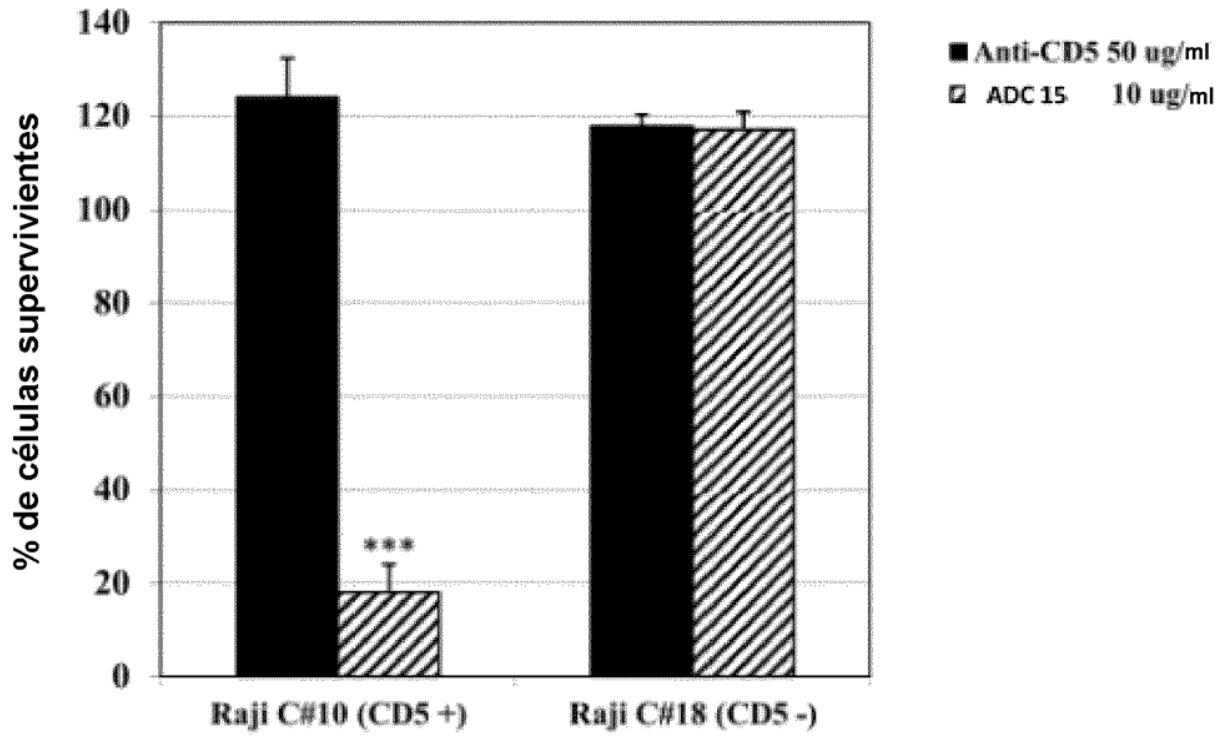


Figura 37

Figura 38



Significación estadística (prueba de la t de Student): \*\*\*  $p < 0,001$