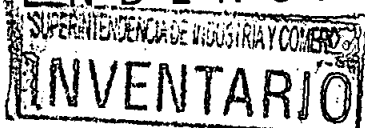




QF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

08-93770

54. TÍTULO

PROFARMACOS MEJORADOS DE ANALOGOS DE CC-1065

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SANOFL-AVENTIS

DOMICILIO

PARIS, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-093770- -00000-0000

 Fecha: 2008-09-05 16:52:57
 Tra. 11 PATENTEIYII
 Act. 411 PRESENTACION

 Dep. 2020 NUECREACION
 Eve: 378 FASENACIONAL
 Folios: 153

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: **SANOFI-AVENTIS**
 sociedad constituida y existente bajo las
 leyes de Francia.

 Dirección: 174, Avenue de France,
 75013 Paris,
 Francia

 Domicilio: Paris,
 Francia

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☐ NIT ☐

 C.E. ☐ Otro ☐

 Número Cual

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

 Nombre: **EMILIO FERRERO**
 Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
 Teléfono: 347 36 11
 Fax: 211 86 50
 E-mail: clientes@cavelier.com
 Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☒ NIT ☐

 C.E. ☐ Otro ☐

 Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. **Robert ZHAO**
 128 Sidney Street,
 Cambridge, Massachusetts 02139,
 Estados Unidos de América

 2. **Ravi V.J. CHARI**
 128 Sidney Street,
 Cambridge, Massachusetts 02139,
 Estados Unidos de América

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/000521

 Fecha: 6 de marzo de 2007

 Publicación Internacional No. WO 2007/102069 A1

 Fecha: 13 de septiembre de 2007

6

Título (54)
PROFARMACOS MEJORADOS DE ANALOGOS DE CC-1065

7

Clasificación Internacional (51) C07D 209/060

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

7 de marzo de 2006

(31) Número de Solicitud

06290379.4

9

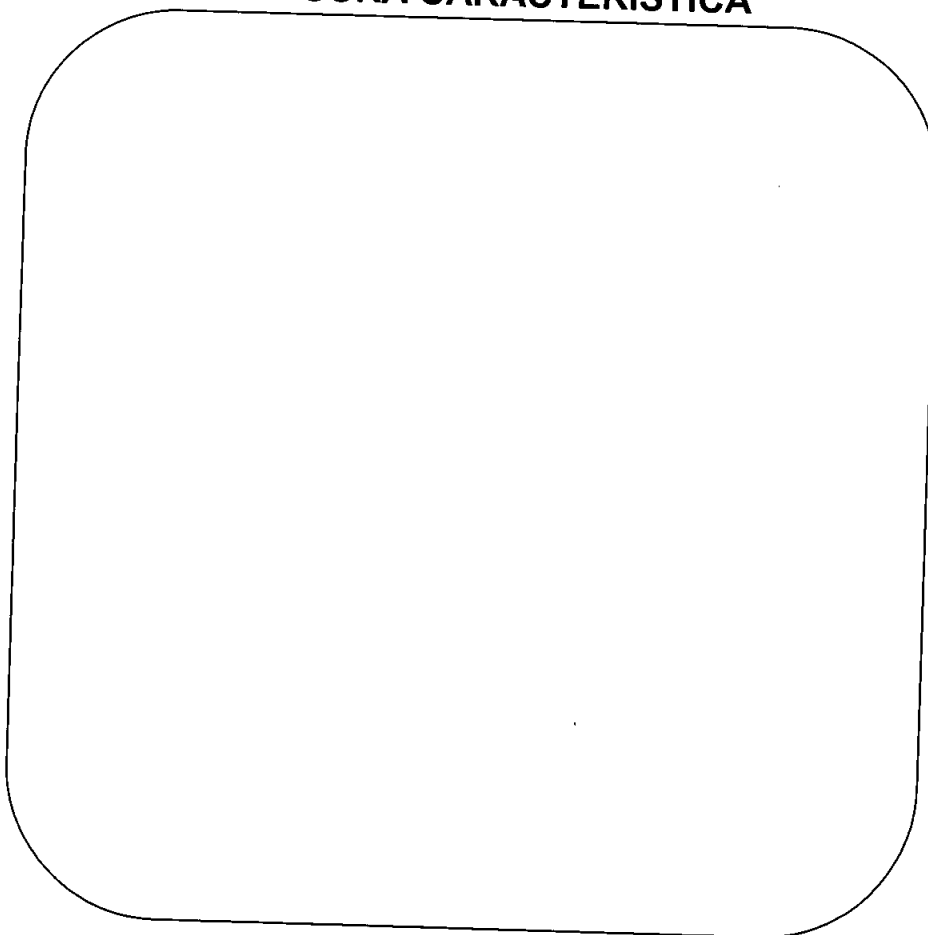
Comprobante de pago No.: 08-69,322
Fecha: 1º de septiembre de 2008

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:EMILIO FERRERO**FIRMA:**

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/102069 A1

Descripción:

Páginas 44 en el idioma original

Páginas 45 en español

Reivindicaciones: Número (s) 34

Figuras: Número (s) 11

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Modificación del inventor Ravi CHARI.
4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
SANOFI-AVENTIS

14775
7804

domiciliado (s) en/of **174, avenue de France**

F-75013 Paris, Francia, hereby ratify the patent

application No. 05.057.645 filed by EMILIO FERRERO on June 14, 2005 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit

CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE EL
FOTOCOPIA IMPEDIMENTO AL ORIGINAL
FOTOCOPIA EN TENIDO A LA VISTA
28 ABR 2008
PABLO MENDEZ, JAS
NOTARIO (E)

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____
en/in _____
por/by _____
Firma _____ Signature _____
Sanofi-Aventis Dr. Markus Jacobi

Vu pour certification
matérielle de la signature
de M. Markus Jacobi
apposée ci-dessus.

NOTARIAT
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

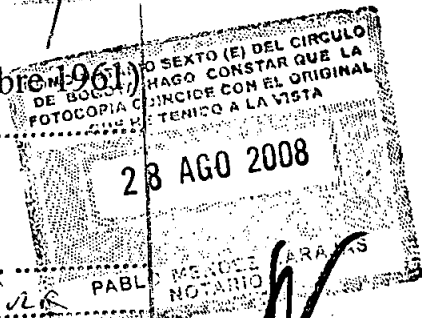
1. - République Française
2. - Le présent acte public
3. - a été signé par M. Koenig
4. - agissant en qualité de NOTAIRE
5. - est revêtu du sceau de Paris

ATTESTE

le 21 JUIN 2005

6. - à Paris
7. - Par le Procureur Général près la Cour d'Appel
8. - Sous N° 81902/2005
9. - Sceau

Le. signature



CERTIFICAT NOTARIE (SOCIETE)

K. L. ASSOCIÉS



Notaires
20, rue de la Paix
75002 PARIS
Tél. 01 55 04 70 00 - Fax 01 40 20 42 43

Le Notaire soussigné certifie : que la signature qui précède de :
Markus JACOBI

Est authentique et que le signataire occupe actuellement le poste de Directeur Operations
Brevets Europe
De la société sanofi-aventis,
et que ladite société fonctionne et est régie par le droit français
que la société est sise 174 avenue de France, 75013 PARIS, France
et que le signataire est habilité à octroyer le présent pouvoir.

Tous les faits susmentionnés sont connus du Notaire qui a examiné les documents
correspondants et les certifie.

Etabli et signé à Paris
Le 20/06/05

Le Notaire
(signature – cachet)



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays :

2. Le présent acte public

3. a été signé par

4. agissant en qualité de

5. est revêtu du sceau/cachet de/du

6. Attesté

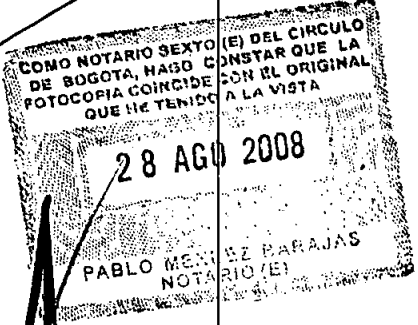
7. le

8. par

9. N°

10. Sceau/cachet :

Signature :



ATTESTATION
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. - République Française
Le présent acte public
2. - a été signé par *M^e K. K. K.*
3. - agissant en qualité de *Notaire*
4. - est revêtu du sceau de *A. C. U. D. H.*
ATTESTE
5. - à Paris le **21 JUIN 2005**
7. - Par le Procureur Général près la Cour d'Appel
8. - Sous N° *81.903*
9. - Sceau
Le. *[Signature]*

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCUITO
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
28 AGO 2008
[Signature]
PABLO MENDEZ BARRERA
NOTARIO (E)

Traducción Oficial No. 20050708 de un documento escrito en Francés y en INGLÉS, el cual, para su identificación se sella con el sello de María Eugenia Sanint Traductora Oficial según Resolución 1448 del Ministerio de Justicia.

LEGALIZACIONES

Escritas en **FRANCES**, al pie de un **PODER** escrito en **ESPAÑOL**, otorgado por **SANOFI- AVENTIS**, a favor de **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA PAEZ Y GERMAN CAVELIER** (por el cual se ratifica la solicitud de patente NO. 05.057.645 presentada por **EMILIO FERRERO** el 14 de junio de 2005.)

(Firma Ilegible)
Dr. Markus Jacobi
Sanofi-Aventis

Visto para la certificación material de la firma del Sr. Markus Jacobi, puesta anteriormente.

(Firma Ilegible)
.L. ASSOCIES
Notarios
20, rue de la Paix
75002 PARIS

Sello del Notario

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El Notario suscrito certifica que la firma puesta anteriormente de

Marcus Jacobi

es auténtica, y que el signatario ocupa actualmente el cargo de Director de Operaciones Patentes Europa, de la sociedad Sanofi-Aventis, y que la dicha sociedad funciona y está regida por el derecho francés; que la sociedad tiene su sede en el 174, avenue de France, 75013, PARIS, Francia, y que el signatario está habilitado para otorgar el presente poder.

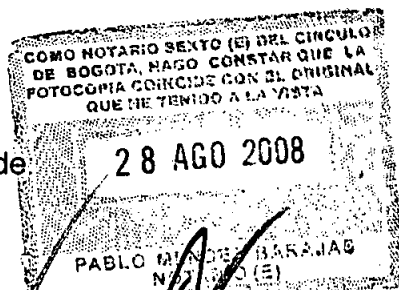
Todos los hechos mencionados anteriormente son de conocimiento del Notario, quien examinó los documentos correspondientes y los certifica.

Dado y firmado en París, hoy, 20 de junio de 2005.

El Notario
(Firma – sello)

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION N. 671 BIS
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RECOLECCION DEL ARCHIVO DEL
5 DE SEPT. 2005
del Ministerio de Justicia



(Ilegible)
Alain Koenig
NOTARIO
20, rue de la Paix, París

APOSTILLA
(Convenio de La Haya del 5 de octubre de 1961)

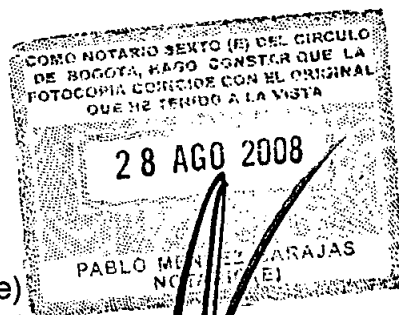
1. País: República Francesa
El presente Documento Público
2. Fue firmado por el Abogado Koenig
3. Quien actúa en calidad de NOTARIO
4. Lleva el sello de SU DESPACHO

Certifica

5. En París
6. El 21 de junio de 2005
7. Por el Procurador General ante el Tribunal de Primera Instancia
8. Bajo el Número 81903
9. Sello/Estampilla:

Sello del Tribunal de Primera Instancia de París.

10- Firma: (Ilegible)



ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA.
Traductora : Maria Eugenia Sanint
Bogotá, 8 de julio de 2005

MARIA EUGENIA SANINT
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCIÓN No. 674 S/S
DEL MINISTERIO DE JUSTICIA

[Firma manuscrita]
[TRADUCTORA OFICIAL]
RESOLUCIÓN No. 113 DEL
DE EL... 30.
del Ministerio de Justicia

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

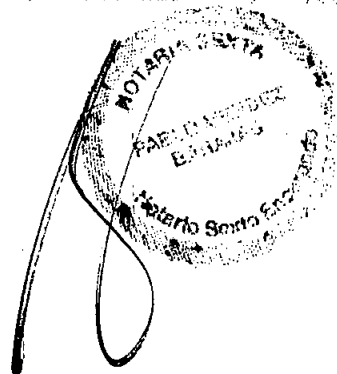
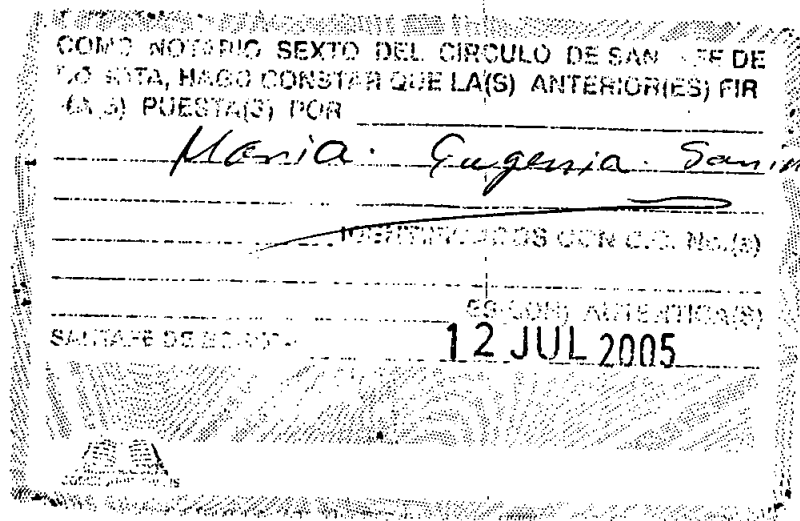
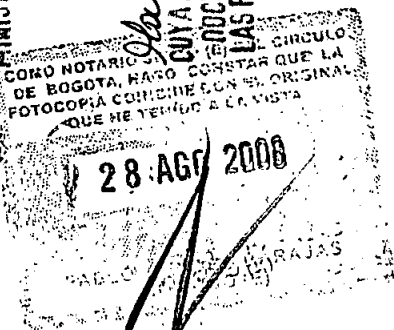
2005 JUL 12 P 1:28

UCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

449243

Samir Samir
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 September 2007 (13.09.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/102069 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 209/60 (2006.01) *A61K 31/4439* (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/000521

(22) International Filing Date: 6 March 2007 (06.03.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06290379.4 7 March 2006 (07.03.2006) EP

(71) Applicants (for all designated States except US):
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174, Avenue De France,
F-75013 Paris (FR). **CHARI, Ravi** [US/US]; 128 Sidney
Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **ZHAO, Robert**
[US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(74) Agents: **COLOMBET, Alain** et al.; CABINET LAVOIX,
2, Place D'estienne D'orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMPROVED PRODRUGS OF CC-1065 ANALOGS

(57) Abstract: Prodrugs of analogs of the anti-tumor antibiotic CC-1065 having a cleavable protective group containing a sulfonic acid containing phenyl carbamate, in which the protecting group confers enhanced water solubility upon the prodrug, and in which the prodrug also has a moiety, such as a sulfide or a disulfide, that can conjugate to a cell binding reagent such as an antibody. The therapeutic use of such prodrug conjugates is also described; such prodrugs of cytotoxic agents have therapeutic use because they can deliver cytotoxic prodrugs to a specific cell population for enzymatic conversion to cytotoxic drugs in a targeted fashion.

WO 2007/102069 A1

IMPROVED PRODRUGS OF CC-1065 ANALOGS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel prodrugs of cytotoxic agents and their therapeutic uses. More specifically, the invention relates to novel prodrugs of cytotoxic agents that are analogs of CC-1065 and which comprise both a moiety for chemical linkage to a cell binding agent and a protecting group that is cleaved *in vivo*. The prodrugs can be chemically linked to cell binding agents to provide therapeutic agents capable of being activated and released *in vivo*, and delivered to specific cell populations in a targeted manner.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many reports have appeared which are directed to the targeting of tumor cells with monoclonal antibody-drug conjugates {Sela et al, in *Immunoconjugates*, pp. 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, in *Targeted Drugs*, pp. 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, in *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, in *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, in *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K.Krauer, 2 *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, in *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; and I. Ojima et al eds, American Chemical Society 2001}. Cytotoxic drugs such as methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, vincristine, vinblastine, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, calicheamicin and maytansinoids have been conjugated to a variety of murine monoclonal antibodies. In some cases, the drug molecules were linked to the antibody molecules through an intermediary carrier molecule such as serum albumin {Garnett et al, 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al, 23 *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al, 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)}, dextran {Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al, 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al, 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); and Shoval et al, 85 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8276-8280 (1988)}, or polyglutamic acid {Tsukada et al, 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al, 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)}.

11

A wide array of linkers is now available for the preparation of such immunoconjugates, including both cleavable and non-cleavable linkers. *In vitro* cytotoxicity tests, however, have revealed that antibody-drug conjugates rarely achieve the same cytotoxic potency as the free unconjugated drugs. This has suggested that mechanisms by which drug molecules are released from conjugated antibodies are very inefficient. Early work in the area of immunotoxins showed that conjugates formed via disulfide bridges between monoclonal antibodies and catalytically active protein toxins were more cytotoxic than conjugates containing other linkers {Lambert et al, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert et al, in *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48 *Cancer Res.* 2610-2617 (1988)}. This improved cytotoxicity was attributed to the high intracellular concentration of reduced glutathione contributing to the efficient cleavage of the disulfide bond between the antibody molecule and the toxin. Maytansinoids and calicheamicin were the first examples of highly cytotoxic drugs that had been linked to monoclonal antibodies via disulfide bonds. Antibody conjugates of these drugs have been shown to possess high potency *in vitro* and exceptional antitumor activity in human tumor xenograft models in mice {R. V. J. Chari et al., 52 *Cancer Res.*, 127-131 (1992); C. Liu et al., 93, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8618-8623 (1996); L.M. Hinman et al., 53, *Cancer Res.*, 3536-3542 (1993); and P.R. Hamann et al, 13, *BioConjugate Chem.*, 40-46 (2002)}.

An attractive candidate for the preparation of such cytotoxic conjugates is CC-1065, which is a potent anti-tumor antibiotic isolated from the culture broth of *Streptomyces zelensis*. CC-1065 is about 1000-fold more potent *in vitro* than are commonly used anti-cancer drugs, such as doxorubicin, methotrexate and vincristine {B.K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982)}.

The structure of CC-1065 (Compound 1, Fig. 1A) has been determined by x-ray crystallography {Martin, D. G. et al, 33 *J. Antibiotics* 902-903 (1980), and Chidester, C. G., et al, 103 *J. Am. Chem. Soc.* 7629-7635 (1981)}. The CC-1065 molecule consists of 3 substituted pyrroloindole moieties linked by amide bonds. The "A" subunit has a cyclopropyl ring containing the only asymmetric carbons in the molecule. While only the relative configuration of these carbons is available from x-ray data, the absolute configuration has been inferred as 3b-*R*, 4a-*S*, by using DNA as a chiral reagent {Hurley, L. H. et al, 226 *Science* 843-844 (1984)}. The "B" and "C" subunits of CC-1065 are identical pyrroloindole moieties.

12

The cytotoxic potency of CC-1065 has been correlated with its alkylating activity and its DNA-binding or DNA-intercalating activity. These two activities reside in separate parts of the molecule. Thus, the alkylating activity is contained in the cyclopropapyrroloindole (CPI) subunit and the DNA-binding activity resides in the two pyrroloindole subunits (Fig. 1A).

However, although CC-1065 has certain attractive features as a cytotoxic agent, it has limitations in therapeutic use. Administration of CC-1065 to mice caused a delayed hepatotoxicity leading to mortality on day 50 after a single intravenous dose of 12.5 µg/kg {V. L. Reynolds et al., *J. Antibiotics*, **XXIX**, 319-334 (1986)}. This has spurred efforts to develop analogs that do not cause delayed toxicity, and the synthesis of simpler analogs modeled on CC-1065 has been described {M.A. Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, **31**, 590-603 (1988)}. In another series of analogs, the CPI moiety was replaced by a cyclopropabenzindole (CBI) moiety {D.L. Boger et al., *J. Org. Chem.*, **55**, 5823-5833, (1990), D.L. Boger et al., *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, **1**, 115-120 (1991)}. These compounds maintain the high *in vitro* potency of the parental drug, without causing delayed toxicity in mice. Like CC-1065, these compounds are alkylating agents that bind to the minor groove of DNA in a covalent manner to cause cell death. However, clinical evaluation of the most promising analogs, Adozelesin and Carzelesin, has led to disappointing results {B.F. Foster et al., *Investigational New Drugs*, **13**, 321-326 (1996); I. Wolff et al., *Clin. Cancer Res.*, **2**, 1717-1723 (1996)}. These drugs display poor therapeutic effects because of their high systemic toxicity.

The therapeutic efficacy of CC-1065 analogs can be greatly improved by changing the *in vivo* distribution through targeted delivery to the tumor site, resulting in lower toxicity to non-targeted tissues, and thus, lower systemic toxicity. In order to achieve this goal, conjugates of analogs and derivatives of CC-1065 with cell-binding agents that specifically target tumor cells have been described {US Patents; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545}. These conjugates typically display high target-specific cytotoxicity *in vitro*, and exceptional anti-tumor activity in human tumor xenograft models in mice {R.V. J. Chari et al., *Cancer Res.*, **55**, 4079-4084 (1995)}.

Cell-binding agents are typically only soluble in aqueous medium, and are usually stored in aqueous solutions. Thus, these analogs should possess sufficient water solubility to allow for efficient reaction with cell-binding agents and subsequent formulation in aqueous solution. In addition, for cell-binding agent conjugates to have a useful shelf life, it

13

is important that CC-1065 analogs that are linked to these cell-binding agents are stable for an extended period of time in aqueous solutions.

The CC-1065 analogs described thus far (see, e.g. Figs. 1B and 1C) are only sparingly soluble in water. Because of the sparing solubility of CC-1065 analogs, conjugation reactions with cell-binding agents currently have to be performed in extremely dilute aqueous solutions. Therefore, these prodrugs should have enhanced water solubility as compared to the parent drugs.

Also, CC-1065 analogs that have been described thus far are quite unstable in aqueous solutions for the following reason. The *seco*-form of the drug is spontaneously converted into the cyclopropyl form, which then may alkylate DNA, if present. However, the competing reaction of the cyclopropyl form with water results in opening of the cyclopropyl ring to yield the hydroxy compound, which is inactive. Thus, there is a need to protect the reactive portion of CC-1065 analogs in order to extend their useful life in aqueous solution, for example by the development of prodrugs of CC-1065 analogs.

There is therefore a need to develop prodrugs of CC-1065 analogs that are very stable upon storage in aqueous solutions. Preferably, these prodrugs should only be converted into active drugs *in vivo*. Once the prodrug is infused into a patient, it should preferably be efficiently converted into active drug.

Carzelesin is a prodrug where the phenolic group in adozelesin is protected as a phenyl carbamate {L.H. Li et al., *Cancer Res.*, **52**, 4904-4913 (1992)}. However, this prodrug is too labile for therapeutic use, and also affords no increase in water solubility compared to the parental drug. In a second example, the phenolic residue of a CC-1065 analog was glycosylated to produce a prodrug (US Patent 5,646,298). However, this prodrug is not converted into active drug *in vivo*, and requires the additional administration of an enzyme from a bacterial source to convert it to the cytotoxic form.

There are a few examples of anticancer drugs, unrelated to CC-1065, that have been converted into water soluble prodrugs. In the anticancer drug irinotecan, the phenolic group is protected by a 4-piperidino-piperidino carbamate. It has been reported that this protecting group confers water solubility to the drug. In addition, the prodrug is readily converted *in vivo* in humans to the active drug, presumably by the enzyme carboxylesterase, which naturally exists in human serum, tumor tissue and in some organs {A. Sparreboom, 4, *Clin. Cancer Res.*, 2747-2754 (1998). L.P. Rivory et al., 52, *Biochem Pharmacol.*, 1103-1111 (1996)}.

Similarly, the anticancer drug etoposide phosphate is an example of a prodrug that has a phosphate protecting group and is rapidly converted into active drug *in vivo*, presumably through hydrolysis by endogenous alkaline phosphatase {S.Z. Fields et al., 1 *Clin. Cancer Res.*, 105-111 (1995)}.

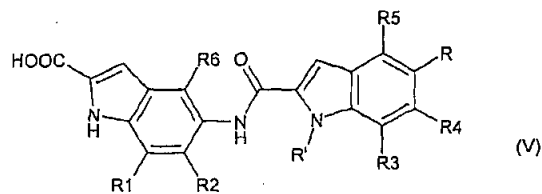
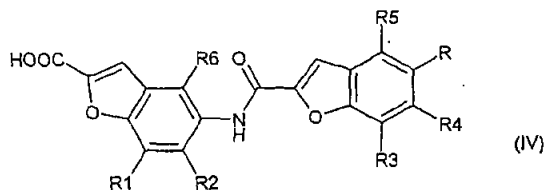
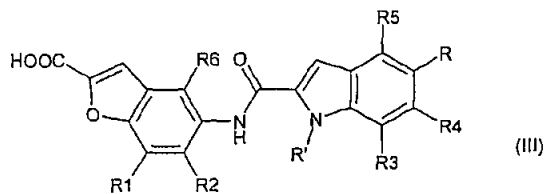
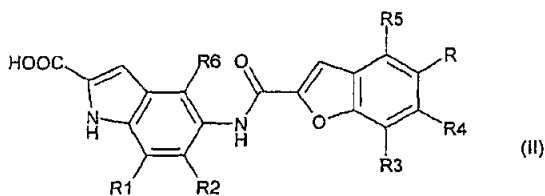
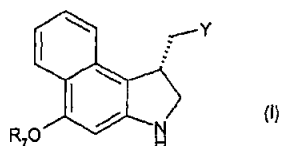
5 Recently R.Y. Zhao et al. (US 6,756,397 B2) disclosed a first class of water soluble prodrugs of CC-1065 analogs which comprise carbamates or phosphate substituents on the phenolic ring of the alkylating portion of the molecule. The present inventors have discovered that solubility of compounds containing these types of substituents may be unsatisfying under physiological conditions. In addition, these compounds may require the
10 action of specific agents such as phosphatases for their conversion into the biologically active form.. There is therefore a general need for analogs of CC-1065 that have increased solubility in aqueous solution and/or may be readily soluble in physiological conditions. Additionally, it is highly desirable to facilitate their conjugation to cell binding agents in aqueous solutions, while preserving their biological activity. In addition, in order to reduce
15 toxic side-effects, it would be advantageous to provide the CC-1065 analog in the form of a prodrug that is converted to the cytotoxic drug predominantly at the desired therapeutic site and preferably through spontaneous hydrolysis at physiological pH. All these advantages and more are provided by the invention described herein, as will be apparent to one of skill in the art upon reading the following disclosure and examples.

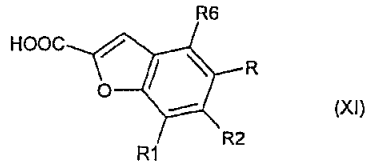
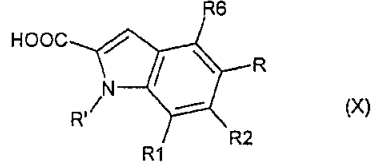
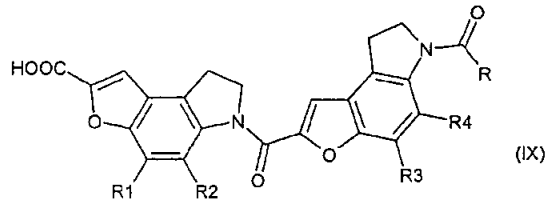
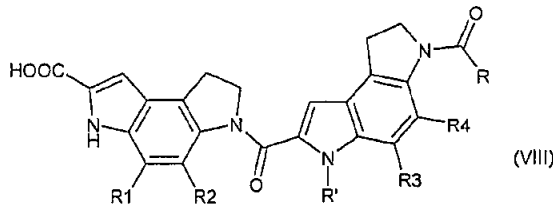
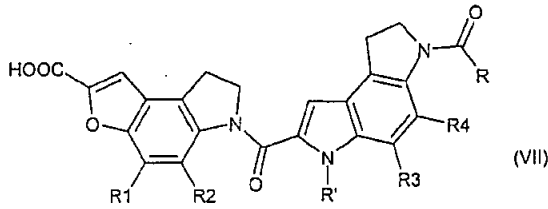
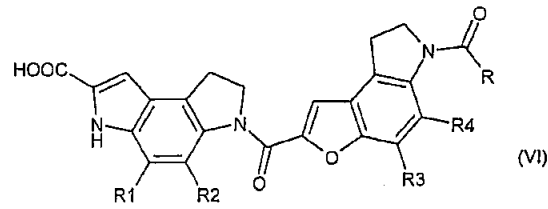
20

SUMMARY OF THE INVENTION

The object of the present invention is to provide prodrugs of CC-1065 analogs, which have enhanced solubility in aqueous medium. This and other objects have been achieved by providing prodrugs in which the phenolic group of the alkylating portion of the
25 molecule is protected with a functionality that renders the drug stable upon storage in acidic aqueous solution. In addition, the protecting group confers increased water solubility to the drug compared to an unprotected analog. The protecting group is readily cleaved *in vivo* at physiological pH to give the corresponding active drug. In the prodrugs described herein, the phenolic substituent is protected as a sulfonic acid containing phenyl carbamate
30 which possesses a charge at physiological pH, and thus has enhanced water solubility. In order to further enhance water solubility, an optional polyethylene glycol spacer can be introduced into the linker between the indolyl subunit and the cleavable linkage such as a disulfide group. The introduction of this spacer does not alter the potency of the drug.

A more specific embodiment of the invention provides a prodrug that comprises an analog of a *seco*-cyclopropabenzindole-containing cytotoxic drug that has a protecting group, which enhances water solubility and stability and that can be cleaved *in vivo* at physiological pH. The prodrug of this specific embodiment has a first and a second subunit that are linked by an amide bond from the secondary amino group of the pyrrole moiety of the first subunit to the C-2 carboxyl of the second subunit. The first subunit is shown as formula (I), and is conjugated to the second subunit, which is selected from among formulae (II)-(XI):





or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers,

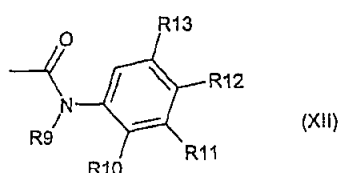
in which:

Y represents a leaving group selected from, but not limited to, a halide (fluoride, chloride, bromide or iodide), methanesulfonate, para-toluenesulfonate, trifluoromethane sulfonate, mono nitro or dinitro phenolate. Preferably the leaving group is a chloride or bromide.

- 5 R, R', R₁-R₆ are each independently hydrogen, C₁-C₃ linear alkyl, methoxy, hydroxyl, primary amino, secondary amino, tertiary amino, or amido or a linker that provides for linkage of the prodrug to a cell binding agent, where such linkage is preferably via a sulfide or disulfide bond, and provided that at least one of R, R', R₁-R₆ is a linker. Preferably, R is a linker. The linker may comprise a polyethylene glycol spacer.

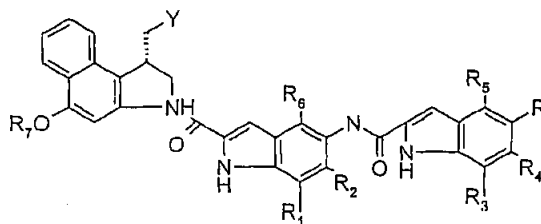
10

R₇ is the protecting group that can be cleaved *in vivo* and enhances water solubility of the cyclopropabenzindole-containing cytotoxic drug, and is a sulfonic acid containing phenyl carbamate. R₇ has the general formula XII:



- 15 where R₉ is H or a C₁-C₄ branched or linear alkyl. R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ are identical or different with at least one being a -X-SO₃⁻M⁺ group with M⁺ being H⁺ or the cation deriving from an atom of the IA group, such as Na⁺, K⁺, etc. and X being a direct link or a spacer chosen from C₁ to C₄ linear or branched alkyl, alkenyl or alkynyl, an -Oalkyl-, -Salkyl- and aminoalkyl and the other R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ being H, a C₁-C₆ branched or linear alkyl, -
- 20 Oalkyl, -Salkyl, hydroxyl, primary amino, secondary amino, or amido, halide, nitro, azido.

According to a preferred embodiment, the prodrug of the invention is of formula :



- 25 wherein Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R are defined as above and where R is a linker as defined herein,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

5 Preferably, said prodrug is chosen from the group consisting in:

(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxy-sulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-methyldithiopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

(S)-N-[2-{{(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylphenyl)-
10 aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl}carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercapto-
propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide

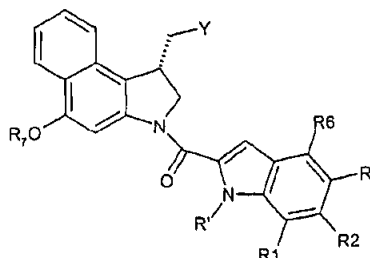
(S)-N-[2-((1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl)carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[[3-(2-pyridyldithio)-propanoyl]-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

15 (S)-N-[2-{{(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyl-oxy]-3H-benz(e)indol-3-yl}carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercapto-propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

(S)-N-[2-((1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl)carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

25 According to another preferred embodiment, the prodrug is of formula:



wherein Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R are defined as above, and where R is a linker as defined above.

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

5 Preferably, said prodrug is chosen from the group consisting in :

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid,

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-(methylidisulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid,

10 or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

The prodrugs of the invention can be used in cytotoxic conjugates in which a cell
15 binding agent is linked to one or more of the prodrugs of the present invention through a linking group.

Said linking group comprises said linker as defined above linked to a function reactive towards thiol, sulfide or disulfide of the cell binding agent.

Cell binding agents include antibodies and fragments thereof, interferons,
20 lymphokines, vitamins, hormones and growth factors. Pharmaceutical compositions containing such conjugates are also provided.

The cytotoxic conjugates can be used in a method for treating a subject by administering an effective amount of the above pharmaceutical composition. According to the cell-type to which the selected cell binding agent binds, many diseases may be treated
25 either *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro*. Such diseases include, for example, the treatment of many kinds of cancers, including lymphomas, leukemias, cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, and the like.

Thus, there are provided prodrugs of CC-1065 analogs that have improved solubility and stability in aqueous solution, and which retain cytotoxicity when activated to produce
30 an alkylating drug, and which are useful in the targeting of specific cell types by means of conjugation to a specific cell binding agent.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1A shows the structure of CC-1065 and its subunits A, B, and C.

Fig. 1B and Fig. 1C show the structures of two known analogs of CC-1065.

Fig. 1D shows the preparation of intermediate DC1SMe (see also US patent 6534660 B1)

5 Fig. 2 shows the structures of exemplary CC-1065 analogs and prodrugs of the present invention.

Fig. 3 shows the structures of exemplary polyethylene glycol-containing prodrugs of the present invention.

Fig. 4 A, and C are synthesis schemes for preparing (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-methyldithiopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC07SMe), (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxy-sulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercapto-propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC07), (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[[3-(2-pyridyldithio)-propanoyl]-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC08SPy), and (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC08), (S)-3-[(1-(chloromethyl)-3-(5-(3-(methyldisulfanyl)-propanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid (DC101SMe), (S)-3-[(1-(chloromethyl)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid (DC107).

Fig. 5 shows the scheme depicting the activation/inactivation process of the drugs at physiological pH.

Fig. 6 shows the *in vitro* cytotoxicity data of DC07-SMe and DC1-SMe towards Ramos and HL60 cells, 5 day exposure.

Fig. 7 shows the *in vitro* cytotoxicity data of DC1-SPy and DC07-Spy towards Ramos and HL60 cells.

30 Fig. 8 shows the *in vitro* cytotoxicity data of DC08-Spy towards RAMOS and Namalwa cells.

Fig 9 shows the *in vitro* cytotoxicity data of DC101-SMe and DC107-SMe towards HL-60 and Ramos cells.

Fig 10 shows the *in vitro* cytotoxicity data of MY9-6-DC07 (disulfide-linked) towards KARA & RAMOS cells.

Fig 11 shows the *in vitro* cytotoxicity data of huC242-DC07 (thioether-linked) towards COLO205 & A-375 cells.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present inventors have found that the stability, water solubility and utility of certain CC-1065 analogs are enhanced by protection of the alkylating moiety of the analog with a suitable protecting group. The inventors have thereby provided prodrugs of CC-1065
10 analogs having enhanced aqueous solubility and which are further capable of linkage to cell binding agents whereby the therapeutic efficacy of such prodrugs of CC-1065 analogs is improved by changing the *in vivo* distribution through targeted delivery of the prodrug to the tumor site, resulting in a lower toxicity to non-targeted tissues, and hence lower systemic toxicity. Physiological pH substantially converts the prodrug to its active drug
15 form, and, in embodiments having a cleavable linker to the cell binding agent, the active drug form of the CC-1065 analog is released, thus further enhancing its cytotoxic activity. Alternatively, the linker to the cell binding agent may be first cleaved inside the target cell to release the prodrug, followed by endogenous conversion into the active drug.

In order to achieve this goal, the inventors synthesized exemplary prodrugs (Fig. 2-
20 4B) of CC-1065 analogs that are *seco*-cyclopropabenzindole (CBI)-containing cytotoxic prodrugs comprising: (a) a first subunit of formula (I) that is protected at the phenolic hydroxyl by a protecting group to enhance water solubility and which is cleaved *in vivo* at physiological pH, and (b) a second subunit having the structure represented by one of formulae (II)-(XI) and which comprises a linker for conjugation of the prodrug to a cell
25 binding agent. The linker can contain a polyethylene glycol spacer (Fig. 3). Removal of the protecting group of the prodrug produces an active form of the drug that retains the high cytotoxicity of the parent drug. The linker is used for conjugation to cell binding agents, preferably comprises a disulfide bond or a sulfide (or called herein thioether) bond.

It has previously been shown that the linkage of highly cytotoxic drugs to antibodies
30 using a cleavable link, such as a disulfide bond, ensures the release of fully active drug inside the cell, and that such conjugates are cytotoxic in an antigen specific manner {R. V. J. Chari et al, 52 Cancer Res. 127-131 (1992); R.V.J. Chari et al., 55 Cancer Res. 4079-4084 (1995); and U.S. Pat. Nos. 5,208,020 and 5,475,092}. In the present invention, the

inventors describe the synthesis of prodrugs of CC-1065 analogs, procedures for their conjugation to monoclonal antibodies and for measurement of the *in vitro* cytotoxicity and specificity of such conjugates. Thus the invention provides useful compounds for the preparation of therapeutic agents directed to the elimination of diseased or abnormal cells that are to be killed or lysed such as tumor cells, virus infected cells, microorganism infected cells, parasite infected cells, autoimmune cells (cells that produce auto-antibodies), activated cells (those involved in graft rejection or graft vs. host disease), or any other type of diseased or abnormal cells, while exhibiting minimal side effects.

Thus, this invention teaches the synthesis of prodrug analogs and derivatives of CC-1065 that can be chemically linked to a cell binding agent and that maintain, upon release of the protective group, the high cytotoxicity of the parent compound CC-1065. Further, upon activation, these compounds when linked to a cell binding agent are cytotoxic to cells to which the cell binding agent binds and are much less toxic to non-target cells.

15 Prodrugs of the present invention

The prodrugs according to the present invention comprise an analog of CC-1065 in which the phenolic group of the alkylating portion of the molecule is protected and the prodrug further comprises a linker capable of conjugating the prodrug to a cell binding agent. The prodrug may comprise a first and a second subunit that are linked via an amide bond.

According to certain embodiments of the present invention, the prodrug of the CC-1065 analog has a first subunit that is a *seco*-CBI (cyclopropabenzindole unit) in its open halomethyl form, wherein the first subunit has a phenolic hydroxyl that is protected by a water-soluble protecting group that can be cleaved *in vivo*. The second subunit of the prodrug of certain embodiments of the present invention comprises an analog of either the B subunit or the combined B and C subunits of CC-1065 (**Fig. 1**) that are 2-carboxy-indole or 2-carboxy-benzofuran derivatives, or both, and are represented by formulae (II)-(XI). As may be ascertained from the natural CC-1065 and from the properties of the analogs that have been published {e.g. Warpehoski et al, 31 J. Med. Chem. 590-603 (1988), Boger et al, 66 J. Org. Chem. 6654-6661 (2001)}, the B and C subunits can also comprise of other heterocycles or substituted heterocycles and thus, can carry different substituents at different positions on the indole or benzofuran rings, corresponding to positions R₁-R₆ of formulae (II)-(XI), and still retain potent cytotoxic activity.

23

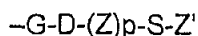
In order to link the prodrug of the CC-1065 analog to a cell-binding agent, the prodrug must first include a moiety that allows the derivatives to be linked to a cell binding agent via a linkage such as a disulfide bond, a sulfide (or called herein thioether) bond, an acid-labile group, a photo-labile group, a peptidase-labile group, or an esterase-labile group. The prodrug analogs are prepared so that they contain a moiety necessary to link the analog to a cell binding agent via, for example, a disulfide bond, a thioether bond, an acid-labile group, a photo-labile group, a peptidase-labile group, or an esterase-labile group. In order to further enhance solubility in aqueous solutions, the linker can contain a polyethylene glycol spacer (**Fig. 3**).

Preferably, a disulfide linkage is used because the reducing environment of the targeted cell results in cleavage of the disulfide and release of the prodrug (or drug, depending on the relative sequence of cleavage of the prodrug from the cell binding agent and hydrolysis of the protecting group), with an associated increase in cytotoxicity.

More specifically, according to certain embodiments of the present invention, the prodrug of an analog of CC-1065 comprises first and second subunits that are covalently linked via an amide bond from the secondary amino group of the pyrrole moiety of the first subunit to the C-2 carboxy group of the second subunit having the formulae (II)-(XI).

Within formulae (II)-(XI), the linker enables linkage of the prodrug of a CC-1065 analog to a cell binding agent. The linker may contain a polyethylene glycol spacer. Examples include moieties that enable linkages via disulfide bond, a thioether bond, an acid-labile group, a photo-labile group, a peptidase-labile group, or an esterase-labile group, and are well-known in the art {see, e.g., U.S. Patent 5,846,545, which is incorporated herein by reference}. Preferred moieties are those that enable linkage via a disulfide bond, for example a thiol (DC1, DC07, DC08) or a disulfide (DC1-SMe, DC07-SMe, DC08SPy, see **Fig. 2-4B**). Mixed disulfides containing any terminal leaving group, such as thiomethyl (DC1-SMe, DC07-SMe), DC08SPy, glutathione, alkyl thiol, pyridylthio, aryl thiol, nitropyridylthio, hydroxycarbonylpyridylthio, (nitro)hydroxycarbonyl-pyridylthio, and the like may be used provided that such disulfides are capable of undergoing a disulfide-exchange reaction for the coupling of the prodrug to a cell binding agent. The linker can optionally further comprise a spacer region interposed between the reactive group of the linkage-enabling portion and the 2-carboxy-indole or 2-carboxy-benzofuran derivative portion.

Preferably, said linker is of formula:



where

G is a single or double bond, -O-, -S- or -NT-;

5

D is a single bond or -E-, -E-NT-, -E-NT-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NT-CO-, -E-NT-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NT-C-S-, -E-NT-CS-F- ;

where T is H or a C₁-C₆ branched or linear alkyl;

10

where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched -(OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_i-Alkyl-,

-(OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_iCycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-,

-(OCH₂CH₂)_iHeterocyclic(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iAryl(OCH₂CH₂)_j-,

15 -(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-,

-Alkyl-(OCH₂CH₂)_i-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iCycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-,

-Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeterocyclic(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iAryl(OCH₂CH₂)_j-,

-Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Cycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Cycloalkyl-,

-Heterocyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heterocyclic-, -Alkyl-Aryl-, -Aryl-Alkyl-,

20 -Alkyl-Heteroaryl-, -Heteroaryl-Alkyl-;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

Z is linear or branched -Alkyl-;

25

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R₂₀ or SR₂₀, wherein R₂₀ represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic.

30

The following embodiments or any of the combinations thereof are preferred:

- G is a single bond or -NT-;

- G is -NT-;

- D is -CO-E-;
- E is a linear or branched -Alkyl-;
- p is 0;
- Z' is H or SR₂₀, wherein R₂₀ represents Alkyl or heteroaryl;

5

Preferred embodiments of the linker include (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCHMeSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCMe₂SZ or (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, wherein: Z represents H, a thiol protecting group such as Ac, R₈ or SR₈, wherein R₈ represents methyl, linear alkyl, branched alkyl, cyclic alkyl, simple or substituted aryl or heterocyclic, and m represents an integer of 0 to 10, n represents an integer of 0 to 2000, p represents an integer of 0 to 10.

Examples of linear alkyls represented by R₈ include methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl and hexyl. Examples of branched alkyls represented by R₈ include isopropyl, isobutyl, sec.-butyl, tert.-butyl, isopentyl and 1-ethyl-propyl. Examples of cyclic alkyls represented by R₈ include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl. Examples of simple aryls represented by R₈ include phenyl and naphthyl. Examples of substituted aryls represented by R₈ include aryls such as phenyl or naphthyl substituted with alkyl groups, with halogens, such as Cl, Br, F, nitro groups, amino groups, sulfonic acid groups, carboxylic acid groups, hydroxy groups and alkoxy groups. Heterocyclics represented by R₈ are compounds wherein the heteroatoms are selected from O, N, and S, and examples include furyl, pyrrolyl, pyridyl, (e.g., a 2-substituted pyrimidine group) and thiophene.

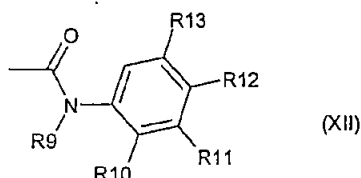
30

Most preferred embodiments of the linker include (CH₂)_pNHCO(CH₂)₂SH, (CH₂)_pNHCO(CH₂)₂C(Me)₂SH, (CH₂)_pNHCO(CH₂)₂SSCH₃, (CH₂)_pNHCO(CH₂)₂

(OCH₂CH₂)_nSH, (CH₂)_pNHCO (CH₂)₂(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SSCH₃ and (CH₂)_pNHCO (CH₂)₂(OCH₂CH₂)_nSSMe.

Within formulae (II)-(XI), R, R', R₁ to R₆, which may be the same or different, independently represent hydrogen, C₁-C₃ linear alkyl, methoxy, hydroxyl, primary amino, secondary amino, tertiary amino, or amido or a linker, provided that at least one of R, R', R₁ to R₆ is a linker. Preferably, R is a linker. Examples of primary amino group-containing substituents are methyl amino, ethyl amino, and isopropyl amino. Examples of secondary amino group-containing substituents are dimethyl amino, diethyl amino, and ethyl-propyl amino. Examples of amido groups include N-methyl-acetamido, N-methyl-propionamido, N-acetamido, and N-propionamido.

Within formulae (II)-(XI), R₇ is an *in vivo*-cleavable protecting group that enhances water solubility of the *seco*-cyclopropabenzindole-containing cytotoxic drug, wherein said group may be chosen from sulfonic containing phenyl carbamate of general formula XII:



where R₉ is H or a C₁-C₄ branched or linear alkyl. R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ are identical or different with at least one being a -X-SO₃⁻M⁺ group with M⁺ being H⁺ or the cation deriving from an atom of the IA group, such as Na⁺, K⁺, etc. and X being a direct link or a spacer chosen from C₁ to C₄ linear or branched alkyl, alkenyl or alkynyl, an -Oalkyl-, -Salkyl- and aminoalkyl and the other R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ being H, a C₁-C₆ branched or linear alkyl, -Oalkyl-, -Salkyl-, hydroxyl, primary amino, secondary amino, or amido, halide, nitro, azido.

Examples of linear alkyls represented by R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ include methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl and hexyl. Examples of branched alkyls represented by R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ include isopropyl, isobutyl, sec.-butyl, tert.-butyl, isopentyl and 1-ethyl-propyl. Examples of cyclic alkyls represented by R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl and cyclohexyl.

Thus, sulfonic containing phenyl carbamates turn out to be cleavable by hydrolysis at physiological pH which occurs in serum and plasma.

27

Sulfide or disulfide-containing and mercapto-containing prodrugs of CC-1065 analogs of the present invention can be evaluated for their ability to suppress proliferation of various unwanted cell lines *in vitro* under incubation conditions. Cell lines such as, for example, Ramos cell line and HL60 can easily be used for the assessment of the cytotoxicity of these compounds. Cells to be evaluated can be exposed to the compounds for 24 hours and the surviving fractions of cells measured in direct assays by known methods. IC₅₀ values can then be calculated from the results of the assays.

As used therein, the expression "linkable to a cell binding agent" refers to the CC-1065 analog prodrugs comprising at least one linker, or a precursor thereof, suitable to bond said derivatives to a cell binding agent; preferred linkers contain thiol, sulfide or disulfide bonds, or precursors thereof.

As used therein, the expression "linked to a cell binding agent" refers to the conjugate molecule comprising at least one CC-1065 analog prodrug bound to a cell binding agent via a suitable linker, or a precursor thereof; preferred linkers contain thiol, sulfide or disulfide bonds, or precursors thereof.

The expression "cell binding agent" included herein also includes modified cell binding agents, wherein said cell binding agent is modified by a modifying agent to improve the reactivity of said cell binding agent towards the reactive functions, e.g. mercapto, sulfide or disulfide bonds of the linker of the CC-1065 analog prodrug. Said modifying agents include N-sulfosuccinimidyl-4-(5-nitro-2-pyridyldithio)butanoate (SSNPB), Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid N-hydroxysuccinimide ester (SPDB), and so on as discussed below.

As used therein, the term "analog" refers to a compound which comprises a chemically modified form of a specific compound or class thereof, and which maintains the pharmaceutical and/or pharmacological activities characteristic of said compound or class.

As used herein, the term "patient" refers to either an animal, such as a valuable animal for breeding, company or preservation purposes, or preferably a human or a human child, which is afflicted with, or has the potential to be afflicted with one or more diseases and conditions described herein.

As used herein, a "therapeutically effective amount" refers to an amount of a compound of the present invention which is effective in preventing, reducing, eliminating, treating or controlling the symptoms of the herein-described diseases and conditions. The term "controlling" is intended to refer to all processes wherein there may be a slowing, interrupting,

arresting, or stopping of the progression of the diseases and conditions described herein, but does not necessarily indicate a total elimination of all disease and condition symptoms, and is intended to include prophylactic treatment.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" refers to those compounds,
5 materials, excipients, compositions or dosage forms which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for contact with the tissues of human beings and animals without excessive toxicity, irritation, allergic response or other problem complications commensurate with a reasonable benefit/risk ratio.

As used herein, "pharmaceutically acceptable salts" refer to derivatives of the disclosed
10 compounds wherein the parent compound is modified by making acid or base salts thereof. The pharmaceutically acceptable salts include the conventional non-toxic salts or the quaternary ammonium salts of the parent compound formed, for example, from non-toxic inorganic or organic acids. For example, such conventional non-toxic salts include those
15 derived from inorganic acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, sulfamic, phosphoric, nitric and the like; and the salts prepared from organic acids such as acetic, propionic, succinic, tartaric, citric, methanesulfonic, benzenesulfonic, glucuronic, glutamic, benzoic, salicylic, toluenesulfonic, oxalic, fumaric, maleic, lactic and the like. Further addition salts
include ammonium salts such as tromethamine, meglumine, epolamine, etc., metal salts such as sodium, potassium, calcium, zinc or magnesium.

20 The pharmaceutically acceptable salts of the present invention can be synthesized from the parent compound which contains a basic or acidic moiety by conventional chemical methods. Generally, such salts can be prepared by reacting the free acid or base forms of these compounds with a stoichiometric amount of the appropriate base or acid in water or in an organic solvent, or in a mixture of the two. Generally, non-aqueous media like ether, ethyl
25 acetate, ethanol, isopropanol, or acetonitrile are preferred. Lists of suitable salts are found in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

According to a still further object, the present invention is also concerned with the
30 process of preparation of the compounds of the invention.

The compounds and process of the present invention may be prepared in a number of ways well known to those skilled in the art. The compounds can be synthesized, for example, by application or adaptation of the methods described below, or variations thereon as

29
appreciated by the skilled artisan. The appropriate modifications and substitutions will be readily apparent and well known or readily obtainable from the scientific literature to those skilled in the art.

In particular, such methods can be found in R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

It will be appreciated that the compounds of the present invention may contain one or more asymmetrically substituted carbon atoms, and may be isolated in optically active or racemic forms. Thus, all chiral, diastereomeric, racemic forms and all geometric isomeric forms of a structure are intended, unless the specific stereochemistry or isomeric form is specifically indicated. It is well known in the art how to prepare and isolate such optically active forms. For example, mixtures of stereoisomers may be separated by standard techniques including, but not limited to, resolution of racemic forms, normal, reverse-phase, and chiral chromatography, preferential salt formation, recrystallization, and the like, or by chiral synthesis either from chiral starting materials or by deliberate synthesis of target chiral centers.

Compounds of the present invention may be prepared by a variety of synthetic routes. The reagents and starting materials are commercially available, or readily synthesized by well-known techniques by one of ordinary skill in the arts. All substituents, unless otherwise indicated, are as previously defined.

In the reactions described hereinafter, it may be necessary to protect reactive functional groups, for example hydroxy, amino, imino, thio or carboxy groups, where these are desired in the final product, to avoid their unwanted participation in the reactions. Conventional protecting groups may be used in accordance with standard practice, for examples see T.W. Greene and P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999; J. F. W. McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Some reactions may be carried out in the presence of a base. There is no particular restriction on the nature of the base to be used in this reaction, and any base conventionally used in reactions of this type may equally be used here, provided that it has no adverse effect on other parts of the molecule. Examples of suitable bases include: sodium hydroxide, potassium carbonate, triethylamine, alkali metal hydrides, such as sodium hydride and potassium hydride; alkyllithium compounds, such as methyllithium and butyllithium; and alkali metal alkoxides, such as sodium methoxide and sodium ethoxide.

Usually, reactions are carried out in a suitable solvent. A variety of solvents may be used, provided that it has no adverse effect on the reaction or on the reagents involved. Examples of

30

suitable solvents include: hydrocarbons, which may be aromatic, aliphatic or cycloaliphatic hydrocarbons, such as hexane, cyclohexane, benzene, toluene and xylene; amides, such as dimethylformamide; alcohols such as ethanol and methanol and ethers, such as diethyl ether and tetrahydrofuran.

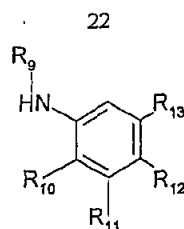
5 The reactions can take place over a wide range of temperatures. In general, we find it convenient to carry out the reaction at a temperature of from 0°C to 150°C (more preferably from about room temperature to 100°C). The time required for the reaction may also vary widely, depending on many factors, notably the reaction temperature and the nature of the reagents. However, provided that the reaction is effected under the preferred conditions
10 outlined above, a period of from 3 hours to 20 hours will usually suffice.

15 The compound thus prepared may be recovered from the reaction mixture by conventional means. For example, the compounds may be recovered by distilling off the solvent from the reaction mixture or, if necessary after distilling off the solvent from the reaction mixture, pouring the residue into water followed by extraction with a water-immiscible organic
15 solvent and distilling off the solvent from the extract. Additionally, the product can, if desired, be further purified by various well known techniques, such as recrystallization, reprecipitation or the various chromatography techniques, notably column chromatography or preparative thin layer chroma-tography.

20 The process of preparation of a compound of formula of the invention is a further object of the present invention.

25 The process of preparation of the compounds of formula comprises the step of protecting the phenolic group of the alkylating portion of the corresponding analog of CC-1065 by a sulfonic acid containing carbamate function. This reaction may be carried out by application or adaptation of the methods for protecting OH groups with a carbamate function disclosed in T.W. Greene and P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd
25 ed., John Wiley and Sons, 1999 or J. F. W. McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Generally, this reaction is carried out with CDI/DMA and the corresponding aminophenylsulfonate derivative of formula:



where R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} are defined as in formula (XII).

The process may include the further step of isolating the obtained product.

5 Preparation of Cell Binding Agents

The prodrug compounds of the invention may be used as conjugates with a cell binding agent as effective therapeutic agents. Cell binding agents may be of any kind presently known, or that become known, and include peptides and non-peptides. Generally, these can be antibodies (especially monoclonal antibodies) or a fragment of an antibody that contains at least one binding site, lymphokines, hormones, growth factors, nutrient-transport molecules (such as transferrin), or any other cell binding molecule or substance.

More specific examples of cell binding agents that can be used include:

- monoclonal antibodies;
- 15 - single chain antibodies;
- fragments of antibodies such as Fab, Fab', $F(ab')_2$ and F_v {Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al, 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1980)};
- interferons;
- 20 - peptides;
- lymphokines such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormones such as insulin, TRH (thyrotropin releasing hormones), MSH (melanocyte-stimulating hormone), steroid hormones, such as androgens and estrogens;
- growth factors and colony-stimulating factors such as EGF, $TGF\alpha$, insulin like growth factor (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF and GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)}; vitamins, such as folate and
- 25 - transferrin {O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)}.

Monoclonal antibody technology permits the production of extremely selective cell binding agents in the form of specific monoclonal antibodies. Particularly well known in the

art are techniques for creating monoclonal antibodies produced by immunizing mice, rats, hamsters or any other mammal with the antigen of interest such as the intact target cell, antigens isolated from the target cell, whole virus, attenuated whole virus, and viral proteins such as viral coat proteins.

5 Selection of the appropriate cell binding agent is a matter of choice that depends upon the particular cell population that is to be targeted, but in general monoclonal antibodies are preferred if an appropriate one is available.

For example, the monoclonal antibody MY9 is a murine IgG₁ antibody that binds specifically to the CD33 Antigen {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521 (1984)} and can be
10 used if the target cells express CD33 as in the disease of acute myelogenous leukemia (AML). Similarly, the monoclonal antibody anti-B4 is a murine IgG₁, that binds to the CD19 antigen on B cells {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} and can be used if the target cells are B cells or diseased cells that express this antigen such as in non-Hodgkin's lymphoma or chronic lymphoblastic leukemia.

15 Additionally, GM-CSF which binds to myeloid cells can be used as a cell binding agent to diseased cells from acute myelogenous leukemia. IL-2, which binds to activated T-cells, can be used for prevention of transplant graft rejection, for therapy and prevention of graft-versus-host disease, and for the treatment of acute T-cell leukemia. MSH, which binds to melanocytes, can be used for the treatment of melanoma.

20

Preparation of Prodrug Conjugates

Conjugates of the prodrugs and a cell binding agent can be formed using any techniques. An indolyl, benzofuranyl, bis-indolyl, bis-benzofuranyl, indolyl-benzofuranyl, or benzofuranyl-indolyl derivative coupled to the seco-CBI analog can be prepared to contain
25 a free amino group and then linked to an antibody or other cell binding agent via an acid labile linker, or by a photolabile linker. The prodrug compounds can be condensed with a peptide having a suitable sequence and subsequently linked to a cell binding agent to produce a peptidase labile linker. Cytotoxic compounds can be prepared to contain a primary hydroxyl group, which can be succinylated and linked to a cell binding agent to
30 produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free prodrug. Preferably, the prodrug compounds are synthesized to contain a free or protected thiol group, with or without a PEG-containing spacer, and then one or more sulfide, disulfide or

thiol-containing prodrugs are each covalently linked to the cell binding agent via a disulfide bond or a thioether bond.

Representative conjugates of the invention are conjugates of prodrugs of CC-1065 analogs with antibodies, antibody fragments, epidermal growth factor (EGF), melanocyte stimulating hormone (MSH), thyroid stimulating hormone (TSH), estrogen, estrogen analogs, androgen, and androgen analogs.

Representative examples of the preparation of various conjugates of prodrugs of CC-1065 analogs and cell binding agents are described below.

10 **Disulfide linkers:** Antibody huMy-9-6 is a genetically humanized form of the murine monoclonal antibody My-9-6 directed against the CD33 antigen found on the surface of human myeloid cells, including the majority of cases of acute myeloid leukemia (AML) (E.J. Favaloro, K.F. Bradstock, A. Kabral, P. Grimsley & M.C. Berndt, *Disease Markers*, 5(4):215 (1987); M.G. Hoffee, D. Tavares, R.J. Lutz, Robert J., PCT Int. Appl. (2004) WO
15 2004043344). My-9-6 can be used for the preparation of conjugates. The antibody is modified with N-succinimidyl-3-pyridyldithio propionate as previously described {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978)} to introduce, on the average, 4 pyridyldithio groups per antibody molecule. The modified antibody is reacted with the thiol-containing prodrug to produce a disulfide-linked conjugate.

20

Thioether Linkers: Thiol-containing derivatives of the present invention can be linked to antibodies and other cell binding agents via a thioether link as previously described (U.S. Pat No. 5,208,020). The antibody or other cell binding agent can be modified with the commercially available compound such as N-succinimidyl 4-
25 (maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC), N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy-(6-amidocaproate), which is a "long chain" analog of SMCC (LC-SMCC). These crosslinking reagents form non-cleavable linkers derived from maleimido-based moieties.

 Crosslinking reagents comprising a haloacetyl-based moiety include N-succinimidyl-
30 4-(iodoacetyl)-aminobenzoate (SIAB), N-succinimidyl iodoacetate (SIA), N-succinimidyl bromoacetate (SBA) and N-succinimidyl 3-(bromo-acetamido)propionate (SBAP). These crosslinking reagents form non-cleavable linkers derived from haloacetyl-based moieties.

34

The modified cell binding agent can be reacted with a thiol-containing drug to provide a thioether-linked conjugate.

Acid-Labile Linkers: Amino group-containing prodrugs of the present invention can be linked to antibodies and other cell binding agents via an acid labile linker as previously described. {W. A. Blattler et al, *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985); U.S. Pat. Nos. 4,542,225, 4,569,789, 4,618,492, 4,764,368}.

Similarly, an hydrazido group-containing prodrug of the present invention can be linked to the carbohydrate portion of antibodies and other cell binding agents via an acid labile hydrazone linker {for examples of hydrazone linkers see B. C. Laguzza et al, *J. Med. Chem.*, 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990)}.

Photo-Labile Linkers: Amine group containing prodrugs of the present invention may be linked to antibodies and other cell binding agents via a photolabile linker as previously described {P. Senter et al, *Photochemistry and Photobiology*, 42, 231-237 (1985); U.S. Pat. No. 4,625,014}.

Peptidase-Labile Linkers: Amine group containing prodrugs of the present invention may also be linked to cell binding agents via peptide spacers. It has been previously shown that short peptide spacers between drugs and macromolecular protein carriers are stable in serum but are readily hydrolyzed by intracellular peptidases {A. Trouet et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982)}. The amino group containing prodrugs may be condensed with peptides using condensing agents such as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-HCl (EDC-HCl) to give a peptide derivative that can be linked to cell binding agents.

Esterase-Labile Linkers: Prodrugs of the present invention bearing a hydroxy alkyl group may be succinylated with succinic anhydride and then linked to a cell binding agent to produce a conjugate that can be cleaved by intracellular esterases to liberate free drug. {For examples see E. Aboud-Pirak et al, *Biochem Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989)}.

CC-1065 analog conjugates of antibodies, antibody fragments, protein or peptide hormones, protein or peptide growth factors and other proteins are made in the same way by

known methods. For example, peptides and antibodies can be modified with cross linking reagents such as *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, *N*-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP), 4-succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyl dithio)-toluene (SMPT), *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) butyrate (SDPB), succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP), 4-(2-pyridyldithio)butanoic acid *N*-hydrosuccinimide ester (SPDB), succinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), *N*-sulfosuccinimidyl-3-(2-(5-nitro-pyridyldithio) butyrate (SSNPB), 2-iminothiolane, or *S*-acetylsuccinic anhydride by known methods. See, Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blattler et al, 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985); Lambert et al, 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983); Klotz et al, 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); and Liu et al, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey and Thorpe, 1 *Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell et al 1 *Anti-Cancer Drug Design* 179-184 (1986). The free or protected thiol-containing cell binding agent thus derived is then reacted with a disulfide- or thiol-containing CC61065 prodrug analog to produce conjugates. The conjugates can be purified by standard column chromatography, HPLC or by gel filtration.

Preferably, monoclonal antibody- or cell binding agent-CC-1065 prodrug analog conjugates are those that are joined via a disulfide bond, as discussed above, that are capable of delivering CC-1065 prodrug analogs.

Such cell binding conjugates may be prepared by known methods such as by modifying monoclonal antibodies with succinimidyl pyridyl-dithiopropionate (SPDP) (Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). The resulting thiopyridyl group is then displaced by treatment with thiol-containing CC-1065 prodrug analogs to produce disulfide linked conjugates. Conjugation by this method is fully described in U.S. Patent 5,585,499, which is incorporated by reference.

Alternatively, in the case of the arylidithio-CC-1065 prodrug analogs, the formation of the cell binding conjugate is effected by direct displacement of the aryl-thiol of the CC-1065 prodrug analog by sulfhydryl groups previously introduced into antibody molecules. Conjugates containing 1 to 10 CC-1065 prodrug analogs linked via a disulfide bridge are readily prepared by either method.

According to a further object, the present invention also concerns pharmaceutical compositions comprising a conjugate molecule of the invention or a compound of formula (I) as defined above together with a pharmaceutically acceptable carrier.

According to a further object, the present invention also concerns a method of killing
5 or inhibiting growth of cells, preferably selected cell populations comprising contacting target cells or tissue containing target cells with an effective amount of the pharmaceutical composition according to the invention.

The selected cell population are those cancerous and/or proliferative cells.

According to a further object, the present invention also concerns a method for
10 treatment, preferably selective treatment, of cancer comprising administering an effective amount of the pharmaceutical composition according to the invention to a patient in need thereof.

According to the present invention, "selective treatment of cancer" refers to killing cancerous and/or proliferative cells substantially without killing normal and/or non-
15 proliferative cells.

According to a further object, the present invention also concerns the use of a conjugate molecule of the invention or a compound of formula (I) as defined above for the preparation of a medicament for treating cancer.

The method for inhibiting the growth of selected cell populations can be practiced *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*.
20

Examples of *in vitro* uses include treatments of cell cultures in order to kill all cells except for desired variants that do not express the target antigen; or to kill variants that express undesired antigen.

The conditions of non-clinical *in vitro* use are readily determined by the skilled
25 artisan.

Examples of *ex vivo* uses include treatments of autologous bone marrow prior to their transplant into the same patient in order to kill diseased or malignant cells; treatments of bone marrow prior to their transplantation in order to kill competent T cells and prevent graft-versus-host-disease (GVHD).

30 Clinical *ex vivo* treatment to remove tumor cells or lymphoid cells from bone marrow prior to autologous transplantation in cancer treatment or in treatment of autoimmune disease, or to remove T cells and other lymphoid cells from allogeneic bone marrow or tissue prior to transplant in order to prevent GVHD, can be carried out as follows. Bone

marrow is harvested from the patient or other individual and then incubated in medium containing serum to which is added the cytotoxic agent of the invention, concentrations range from about 10 μ M to 1 pM, for about 30 minutes to about 48 hours at about 37 °C. The exact conditions of concentration and time of incubation (=dose) are readily
 5 determined by the skilled artisan. After incubation the bone marrow cells are washed with medium containing serum and returned to the patient by i.v. infusion according to known methods. In circumstances where the patient receives other treatment such as a course of ablative chemotherapy or total-body irradiation between the time of harvest of the marrow and reinfusion of the treated cells, the treated marrow cells are stored frozen in liquid
 10 nitrogen using standard medical equipment.

For clinical *in vivo* use, the cytotoxic agent of the invention will be supplied as solutions that are tested for sterility and for endotoxin levels or as a lyophilized solid that can be redissolved in sterile water for injection. Examples of suitable protocols of conjugate administration are as follows. Conjugates are given weekly for 6 weeks as an i.v. bolus.
 15 Bolus doses are given in 50 to 400 ml of normal saline to which human serum albumin (e.g. 0.5 to 1 mL of a concentrated solution of human serum albumin, 100 mg/mL) can be added. Dosages will be about 50 μ g to 10 mg/kg of body weight per week, i.v. (range of 10 μ g to 100 mg/kg per injection). Six weeks after treatment, the patient may receive a second course of treatment. Specific clinical protocols with regard to route of administration,
 20 excipients, diluents, dosages, times, etc., can be determined by the skilled artisan as the clinical situation warrants.

Examples of medical conditions that can be treated according to the *in vivo* or *ex vivo* methods of killing selected cell populations include malignancy of any type including, for example, cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, ovary, and
 25 lymphatic organs; melanomas; autoimmune diseases, such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis; graft rejections, such as renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection; graft versus host disease; viral infections, such as CMV infection, HIV infection, AIDS, etc.; bacterial infection; and parasite infections, such as
 30 giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, and others as determined by one skilled in the art.

The identification of those subjects who are in need of treatment of herein-described diseases and conditions is well within the ability and knowledge of one skilled in the art. A

veterinarian or a physician skilled in the art can readily identify, by the use of clinical tests, physical examination, medical/family history or biological and diagnostic tests, those subjects who are in need of such treatment.

5 A therapeutically effective amount can be readily determined by the attending
diagnostician, as one skilled in the art, by the use of conventional techniques and by observing
results obtained under analogous circumstances. In determining the therapeutically effective
amount, a number of factors are considered by the attending diagnostician, including, but not
limited to: the species of subject; its size, age, and general health; the specific disease
involved; the degree of involvement or the severity of the disease; the response of the
10 individual subject; the particular compound administered; the mode of administration; the
bioavailability characteristic of the preparation administered; the dose regimen selected; the
use of concomitant medication; and other relevant circumstances.

The amount of a compound of formula (I) or conjugate, which is required to achieve the
desired biological effect, will vary depending upon a number of factors, including the chemical
15 characteristics (e.g. hydrophobicity) of the compounds employed, the potency of the
compounds, the type of disease, the species to which the patient belongs, the diseased state
of the patient, the route of administration, the bioavailability of the compound by the chosen
route, all factors which dictate the required dose amounts, delivery and regimen to be
administered.

20 As used herein, "pharmaceutically acceptable excipient" includes any carriers,
diluent, adjuvants, or vehicles, such as preserving or antioxidant agents, fillers,
disintegrating agents, wetting agents, emulsifying agents, suspending agents, solvents,
dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption
delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active
25 substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is
incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is
contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the
compositions as suitable therapeutic combinations.

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein,
30 means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or
condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or
condition.

29

In general terms, the compounds of this invention may be provided in an aqueous physiological buffer solution containing 0.1 to 10 % w/v compound for parenteral administration. Typical dose ranges are from 1 µg/kg to 0.1 g/kg of body weight per day; a preferred dose range is from 0.01 mg/kg to 10 mg/kg of body weight per day or an equivalent dose in a human child. The preferred dosage of drug to be administered is likely to depend on such variables as the type and extent of progression of the disease or disorder, the overall health status of the particular patient, the relative biological efficacy of the compound selected, the formulation of the compound, the route of administration (intravenous, intramuscular, or other), the pharmacokinetic properties of the compound by the chosen delivery route, and the speed (bolus or continuous infusion) and schedule of administrations (number of repetitions in a given period of time).

The compounds of the present invention are also capable of being administered in unit dose forms, wherein the term "unit dose" means a single dose which is capable of being administered to a patient, and which can be readily handled and packaged, remaining as a physically and chemically stable unit dose comprising either the active compound itself, or as a pharmaceutically acceptable composition, as described hereinafter. As such, typical total daily dose ranges are from 0.01 to 100 mg/kg of body weight. By way of general guidance, unit doses for humans range from 1 mg to 3000 mg per day. Preferably the unit dose range is from 1 to 500 mg administered one to six times a day, and even more preferably from 10 mg to 500 mg, once a day. Compounds provided herein can be formulated into pharmaceutical compositions by admixture with one or more pharmaceutically acceptable excipients. Such unit dose compositions may be prepared for use by oral administration, particularly in the form of tablets, simple capsules or soft gel capsules; or intranasally, particularly in the form of powders, nasal drops, or aerosols; or dermally, for example, topically in ointments, creams, lotions, gels or sprays, or via trans-dermal patches.

The compositions may conveniently be administered in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the pharmaceutical art, for example, as described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Preferred formulations include pharmaceutical compositions in which a compound of the present invention is formulated for oral or parenteral administration.

For oral administration, tablets, pills, powders, capsules, troches and the like can contain one or more of any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder

such as microcrystalline cellulose, or gum tragacanth; a diluent such as starch or lactose; a disintegrant such as starch and cellulose derivatives; a lubricant such as magnesium stearate; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, or methyl salicylate. Capsules can be in the form of a hard capsule or soft capsule, which are generally made from gelatin blends optionally blended with plasticizers, as well as a starch capsule. In addition, dosage unit forms can contain various other materials that modify the physical form of the dosage unit, for example, coatings of sugar, shellac, or enteric agents. Other oral dosage forms syrup or elixir may contain sweetening agents, preservatives, dyes, colorings, and flavorings. In addition, the active compounds may be incorporated into fast dissolve, modified-release or sustained-release preparations and formulations, and wherein such sustained-release formulations are preferably bi-modal. Preferred tablets contain lactose, cornstarch, magnesium silicate, croscarmellose sodium, povidone, magnesium stearate, or talc in any combination.

Liquid preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. The liquid compositions may also include binders, buffers, preservatives, chelating agents, sweetening, flavoring and coloring agents, and the like. Non-aqueous solvents include alcohols, propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include mixtures of alcohols and water, buffered media, and saline. In particular, biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be useful excipients to control the release of the active compounds. Intravenous vehicles can include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose, and the like. Other potentially useful parenteral delivery systems for these active compounds include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes.

Alternative modes of administration include formulations for inhalation, which include such means as dry powder, aerosol, or drops. They may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or oily solutions for administration in the form of nasal drops, or as a gel to be applied intranasally. Formulations for buccal administration include, for example, lozenges or pastilles and may also include a flavored base, such as sucrose or acacia, and other excipients such as glycocholate. Formulations suitable for rectal administration are preferably presented as unit-dose suppositories, with a solid based carrier, such as cocoa butter, and may include a salicylate.

41

Formulations for topical application to the skin preferably take the form of an ointment, cream, lotion, paste, gel, spray, aerosol, or oil. Carriers which can be used include petroleum jelly, lanolin, polyethylene glycols, alcohols, or their combinations. Formulations suitable for transdermal administration can be presented as discrete patches and can be lipophilic emulsions or buffered, aqueous solutions, dissolved and/or dispersed in a polymer or an adhesive.

***In Vitro* Cytotoxicity of Conjugates Between Cell Binding Agents and Prodrugs of the present invention**

10 Cytotoxicity of the prodrugs of the present invention and their conjugates with cell binding agents can be measured after cleavage of the protecting group and conversion into the active drug. Cytotoxicity to non-adherent cell lines such as Namalwa and HL60 can be measured by back-extrapolation of cell proliferation curves as described in Goldmacher et al, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). Cytotoxicity of these compounds to adherent cell
15 lines such as A-375 and SCaBER can be determined by clonogenic assays as described in Goldmacher et al, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

Therapeutic Agent and Method for Inhibiting the Growth of Selected Cell Populations

20 The present invention also provides a therapeutic agent for inhibiting the growth of selected cell populations comprising:

(a) a cytotoxic amount of one or more of the above-described prodrugs linked to a cell binding agent, and

(b) a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

25 Similarly, the present invention provides a method for inhibiting the growth of selected cell populations comprising contacting a cell population or tissue suspected of containing cells from said selected cell population with a cytotoxic amount of a cytotoxic agent comprising one or more of the above-described prodrugs linked to a cell binding agent.

The cytotoxic agent is prepared as described above.

30 Suitable pharmaceutically acceptable carriers, diluents, and excipients are well known and can be determined by those of skill in the art as the clinical situation warrants.

Examples of suitable carriers, diluents and/or excipients include: (1) Dulbecco's phosphate buffered saline, pH about 7.4, containing about 1 mg/ml to 25 mg/ml human serum albumin, (2) 0.9% saline (0.9% w/v NaCl), and (3) 5% (w/v) dextrose.

The method for inhibiting the growth of selected cell populations can be practiced *in vitro*, *in vivo*, or *ex vivo*.

Examples of *in vitro* uses include treatments of cell cultures in order to kill all cells except for desired variants that do not express the target antigen; or to kill variants that express undesired antigen.

The conditions of non-clinical *in vitro* use are readily determined by the skilled artisan.

Examples of *ex vivo* uses include treatments of autologous bone marrow prior to their transplant into the same patient in order to kill diseased or malignant cells; treatments of bone marrow prior to their transplantation in order to kill competent T cells and prevent graft-versus-host-disease (GVHD).

Clinical *ex vivo* treatment to remove tumor cells or lymphoid cells from bone marrow prior to autologous transplantation in cancer treatment or in treatment of autoimmune disease, or to remove T cells and other lymphoid cells from allogeneic bone marrow or tissue prior to transplant in order to prevent GVHD, can be carried out as follows. Bone marrow is harvested from the patient or other individual and then incubated in medium containing serum to which is added the cytotoxic agent of the invention, concentrations range from about 10 μ M to 1 pM, for about 30 minutes to about 48 hours at about 37 °C. The exact conditions of concentration and time of incubation (=dose) are readily determined by the skilled artisan. After incubation the bone marrow cells are washed with medium containing serum and returned to the patient by i.v. infusion according to known methods. In circumstances where the patient receives other treatment such as a course of ablative chemotherapy or total-body irradiation between the time of harvest of the marrow and reinfusion of the treated cells, the treated marrow cells are stored frozen in liquid nitrogen using standard medical equipment.

For clinical *in vivo* use, the cytotoxic agent of the invention will be supplied as solutions that are tested for sterility and for endotoxin levels or as a lyophilized solid that can be redissolved in sterile water for injection. Examples of suitable protocols of conjugate administration are as follows. Conjugates are given weekly for 6 weeks as an i.v. bolus. Bolus doses are given in 50 to 400 ml of normal saline to which human serum albumin

43

(e.g. 0.5 to 1 mL of a concentrated solution of human serum albumin, 100 mg/mL) can be added. Dosages will be about 50 µg to 10 mg/kg of body weight per week, i.v. (range of 10 µg to 100 mg/kg per injection). Six weeks after treatment, the patient may receive a second course of treatment. Specific clinical protocols with regard to route of administration, excipients, diluents, dosages, times, etc., can be determined by the skilled artisan as the clinical situation warrants.

Examples of medical conditions that can be treated according to the *in vivo* or *ex vivo* methods of killing selected cell populations include malignancy of any type including, for example, cancer of the lung, breast, colon, prostate, kidney, pancreas, ovary, and lymphatic organs; melanomas; autoimmune diseases, such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis; graft rejections, such as renal transplant rejection, liver transplant rejection, lung transplant rejection, cardiac transplant rejection, and bone marrow transplant rejection; graft versus host disease; viral infections, such as CMV infection, HIV infection, AIDS, etc.; bacterial infection; and parasite infections, such as giardiasis, amoebiasis, schistosomiasis, and others as determined by one skilled in the art.

EXAMPLES

The invention will now be illustrated by reference to non-limiting examples. Unless otherwise stated, all percents, ratios, parts, etc. are by weight.

MATERIALS AND METHODS

Melting points were measured using an Electrothermal apparatus and are uncorrected. NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE400 (400 MHz) spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm relative to TMS as an internal standard. Mass spectra were obtained using a Bruker Esquire 3000 system. Ultraviolet spectra were recorded on a Hitachi U1200 spectrophotometer. HPLC was performed using a Beckman Coulter GOLD 125 system equipped with a Beckman Coulter system GOLD 168 variable wavelength detector and a Waters Radialpak (a reverse phase C-18 column). Thin layer chromatography was performed on Analtech GF silica gel TLC plates. Silica gel for flash column chromatography was from Baker. Tetrahydrofuran was dried by distillation over sodium metal. Dimethylacetamide and dimethylformamide were dried by distillation over

calcium hydride under reduced pressure. All other solvents used were reagent grade or HPLC grade.

The synthesis of prodrugs DC07 (**7a**), DC08 (**8a**) and DC107 (**Fig. 4**) is described herein. DC07 and DC08 as well as DC107 are derived from the parent drug DC1 and DC101, while DC09 (**9a**) can be prepared from the pegylated parent drug DC5 which was described in US patent 6,756,397 B2 (**FIG. 3**). The prodrugs DC07 is extremely stable in aqueous solutions at pH 5.5 or below, and can be converted into the parent drug DC1 by incubation in serum or plasma. These drugs also have enhanced water solubility as compared with DC1. Incubation of DC07SMe in mice serum converts it into the parent drug DC1SMe.

The human cancer cell lines HL60, Namalwa, A-375, COLO205 and Ramos were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Kara is a murine tumor cell line that has been stably transfected with the human CD33 antigen.

EXAMPLE 1

*Preparation of (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-methyldithiopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC07-SMe, **7b**)*

To a solution of 11.6 mg (0.017 mmol) of DC1SMe (1-[S]-(chloromethyl)-5-hydroxy-3-[[5-[5-(3-methyldithiopropionyl)indol-2-yl-carbonylamino]indole-2-yl]carbonyl]-1,2-dihydro-3H-benz[e]indole) in 2.5 ml of DMA was added 3.0 μ l of DIPEA. After stirred under Ar for 3 min., 4.0 mg of carbonyldiimidazole (1.46 eq) was added. The mixture was stirred for 2 hours and TLC showed all DC1SMe was consumed, then fresh prepared 16 mg (3 eq) of 3-aminobenzenesulfonate diisopropylethylamine salt (pH 5) was added. The mixture was stirred under Ar overnight and HPLC showed the reaction completed. The mixture was evaporated with oil pump and purified with C-18 column (1.0 x 5 cm) eluted with from 100% of 0.01% acetic acid to 50% of 0.01% acetic acid and 50% THF. The fractions were pooled and evaporated to yield 11.8 mg of the title compound (DC07SMe); ¹H NMR (DMF-d₇) 11.85 (br, 2H), 11.79 (s, 1H), 11.70 (s, 1H), 10.53 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.21 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 8.12 (m, 1H), 7.46 (dd, 1H, J = 1.9, 8.8 Hz), 7.66 (m, 2H), 7.61 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 7.58 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, J = 1.4 Hz), 7.45 (dd, 1H, J = 1.9, 8.8 Hz), 7.35 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 5.01 (t, 1H, J = 10.0 Hz), 4.84 (dd, 1H, J = 2.2, 10.9 Hz), 4.49 (m, 2H), 4.21 (dd, 1H, J = 3.2, 11.3 Hz), 4.10 (m, 2H),

45
3.12 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.49 (s, 3H); ¹³C NMR 172.52, 170.33, 169.54, 162.94, 161.20, 160.41, 152.67, 147.94, 142.69, 139.11, 134.73, 134.56, 133.72, 133.37, 133.18, 132.16, 130.72, 128.76, 128.41, 128.34, 125.71, 125.61, 124.07, 123.16, 121.51, 120.05, 118.36, 113.54, 112.97, 112.92, 112.16, 111.61, 108.14, 107.56, 106.78, 104.02, 69.03, 67.95, 67.37, 55.84, 54.91, 48.13, 42.71, 37.05, 34.10, 23.12; MS m/z⁺ 831.14 (M + H)⁺, 883.0, 883.9, 884.9 (M+Na)⁺, 905.0, (M+K)⁺ 920.9, 922.9; MS m/z⁻ 880.8, 881.8, 882.8, 883.8 (M-H)⁻.

EXAMPLE 2

10 Preparation of (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylphenyl)-aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercapto-propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC07, 7a)

A solution of 10 mg (0.104 mmol) of TCEP in 2 ml of H₂O was adjusted to pH 7.0 with adding NaHCO₃ powder. To the solution was added 15 mg of DC07SMe in 3ml of DMA followed addition 5 mg of DTT in 1.0 ml 200mM NaH₂PO₄, pH 4.5. After stirred for 2 h and MS showed the DC07SMe peak (m/z 883 (M-1)) disappeared, the mixture was concentrated and purified with preparative HPLC c-18 column eluted from 60% of 10 mM NaH₂PO₄ and 40% DMA to 80% DMA in 40 min. The collected fractions was pooled, concentrated, redissolved in DMA, filtered the salts, evaporated again to afford 13 mg of DC07. MS m/z⁻ 835.1 (M-H), 836.1, 837.1, 838.1

EXAMPLE 3

25 Preparation of (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-(2-pyridyldithio)-propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC08SPy):

21.0 mg of (DC1SPy) in 2 ml of DMA was added 10 microliter of diisopropylethylamine (DIPEA). After stirred for 3 min under Ar, 8.0 mg of carbonyl diimidazole (CDI) was added, and the mixture was stirred for 2 hrs, checked by HPLC on C-18 column, the DC1SPy was completely reacted with CDI. To the mixture was added 20 mg of 4-aminobenzyl sulfonic acid and 10 microliter DIPEA. After stirred overnight, the mixture was concentrated and purified by HPLC on C-18 column eluted from 30% DMA in 10 mM NaH₂PO₄, pH 4.0 to 80% DMA in 10 mM NaH₂PO₄, pH 4.0. The fraction was pooled, concentrated to afford 20.2 mg of the title compound. ¹H NMR (DMF-d₇) 11.67 (d,

2H, J = 9.9 Hz), 10.58 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 9.81 (s, 1H), 8.86 (dddd, 1H, J = 0.8, 1.6, 2.5, 14.6), 8.41 (s, 1H), 8.27 - 8.20 (m, 4H), 8.12 (m, 1H), 7.95 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.83 (m, 1H), 7.71 (dd, 1H, J = 2.0, 9.9 Hz), 7.60 - 7.51 (m, 4H), 7.47 - 7.40 (m, 4H), 7.30 (d, 1H, J = 1.6 Hz), 4.90 (t, 1H, J = 10.0 Hz), 4.75 (dd, 1H, J = 2.2, 10.9 Hz), 4.33 (m, 1H), 4.15 (dd, 1H, J = 3.2, 11.3 Hz), 4.11 (s, 2H), 3.97 (dd, 1H, J = 7.8, 11.0 Hz), 3.29 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 2.76 (m, 3H); ¹³C NMR 172.35, 162.93, 161.20, 160.41, 155.77, 151.36, 147.94, 142.69, 140.14, 139.11, 134.73, 134.56, 133.82, 133.37, 132.97, 132.16, 131.49, 129.22, 128.82, 128.34, 125.01, 125.61, 124.17, 123.76, 121.81, 120.05, 119.32, 116.43, 113.31, 112.97, 112.92, 112.16, 111.61, 108.14, 107.56, 106.83, 101.78, 67.37, 56.37, 48.13, 42.71, 37.00, 34.10; MS m/z⁺ 958.34 (M-1).

4-Aminobenzyl Sulfonic Acid:

A 250 ml of Parr hydrogenation bottle was charged 4-Nitrobenzyl Sulfonic Acid (6.80 g, 31.34 mmol), 10% Pd/C (0.4 g), CH₃OH (150 ml) with few drop of water, and purged with hydrogen. The reaction mixture was shaken with 20 psi H₂ over night. The catalyst was removed by filtration through celite and the solvent was evaporated. The crude compound was co-evaporated three times with 3 x 50 ml of water and crystallized with water/THF/EtAc/Toluene (1:10:10:100) to give 5.3 g (91%) of the title compound. ¹H NMR (D₂O), 7.28(dd, 2H, J = 2.2, 4.3 Hz), 6.95 (dd, 2H, J = 2.2, 4.3 Hz), 4.10 (s, 2H); ¹³C NMR 134.30, 127.10, 121.04, 120.42, 59.14; MS m/z⁺ 186.35 (M-H).

4-Nitrophenylthiol Acetate:

To the solution of 5 ml (69.95 mmol) of thiolacetic acid and 12 ml of triethyl amine in 75 ml of toluene was added dropwise 7.5 g (34.71 mmol) of 4-nitrobenzyl bromide in 100 ml of 1:2 THF/Toluene for 4 hours. The mixture was continuously stirred overnight, evaporated and crystallized with EtAc/Toluene/Hexane to afford 7.1 g (96%) of the title compound. ¹H NMR (CDCl₃) 8.13 (ddd, 2H, J = 2.5, 4.5, 9.3 Hz), 7.44 (ddd, 2H, J = 2.5, 4.5, 9.3 Hz), 4.14 (s, 2H), 2.35 (s, 3H); ¹³C NMR 194.53, 145.73, 129.91, 124.07, 32.93, 30.50; MS M⁺ 234.34 (M + Na).

4-Nitrobenzyl Sulfonic Acid:

7.0 g of 4-nitrophenylthiol acetate was added in 150 ml of 1:3 H₂O₂/HAc solution in 5 portion in 4 h and the mixture was continuously stirred overnight. The mixture was evaporated and co-evaporated three times with 3 x 50 ml water, crystallized with
5 CH₃OH/THF/Toluene to afford 6.82 g (95%) of the title compound. ¹H NMR (D₂O) 8.02 (ddd, 2H, J = 2.7, 4.6, 11.1 Hz), 7.20 (ddd, 2H, J = 2.6, 4.6, 11.1 Hz), 4.11 (s, 2H); ¹³C NMR 141.70, 139.30, 129.91, 122.07, 59.15; MS m/z 216.21 (M -H)

EXAMPLE 4

10 *Preparation of (S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide (DC08)*

A solution of 10 mg (0.104 mmol) of TCEP in 2 ml of H₂O was adjusted to pH 7.0 with adding NaHCO₃ powder. To the solution was added 15 mg of DC08SPy in 3ml of
15 DMA followed addition 5 mg of DTT in 1.0 ml 200mM NaH₂PO₄, pH 4.5. After stirred for 2 h and MS showed the DC08SPy peak (m/z 883 (M-1)) disappeared, the mixture was concentrated and purified with preparative HPLC c-18 column eluted from 60% of 10 mM NaH₂PO₄ / 40% DMA to 20% of 10 mM NaH₂PO₄ / 80% of DMA in 40 min. The collected fractions was pooled, concentrated to dryness, redissolved in DMA, filtered the salts,
20 evaporated again to afford 13 mg of DC08. MS m/z 849.1 (M-H), 850.1, 851.1.

EXAMPLE 5

(S)-N-(2-(1-(chloromethyl)-5-hydroxy-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indole-3-carbonyl)-1H-indol-5-yl)-3-(methyldisulfanyl)propanamide (DC101SMe)

25 To a solution of 5-hydroxy-3-amino-1-[S]-(chloromethyl)-1,2-dihydro-3H-benz(e)indole, hydrochloride salt (155 mg, 0.57 mmol) and 5-(3-(methyl-disulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-carboxylic acid (170 mg, 0.55 mmol) in 7.0 ml of DMA was added EDC (300 mg, 1.56 mmol) under Ar. After stirred over night, the mixture was evaporated to dryness, purified by SiO₂ chromatography (20% to 40% THF in toluene) and
30 crystallized with THF/Toluene/Hexane to afford 218 mg (76%) of DC₁₀₁SMe. ¹H NMR (DMF-d₇) 11.63 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.23 (s, 2H), 7.93 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 7.56 (dd, 1H, J = 2.0, 8.1 Hz), 7.52 (s, 1H), 7.47 (dd, 1H, J = 1.9, 8.9 Hz), 7.41 (d, 1H, J =

1.7 Hz), 7.25 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 4.88 (dd, 1H, J = 8.7, 11.0 Hz), 4.73 (dd, 1H, J = 2.3, 10.9 Hz), 4.31 (m, 1H), 4.12 (dd, 1H, J = 3.1, 11.0 Hz), 3.95 (dd, 1H, J = 8.4, 11.2 Hz), 3.21 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.71 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.45 (s, 3H); ¹³C NMR 169.54, 161.06, 155.36, 134.21, 133.39, 132.54, 131.05, 128.39, 127.99, 123.98, 123.74, 123.46, 123.31, 118.88, 115.99, 112.87, 112.31, 106.40, 101.33, 55.93, 48.10, 42.61, 36.92, 30.81, 25.34. MS m/z+ 548.2 (M+Na), 550.2 (M+2+Na).

5-(3-(methylidisulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-carboxylic acid

To the solution of 3-(methylidisulfanyl)propanoic acid (1.18 g, 7.76 mmol) in 50 ml of DMA was added hydroxysuccinimide (1.14 g, 9.90 mmol) and EDC (1.91 g, 9.96 mmol) under argon. The mixture was stirred over night. After confirmed completion by TLC (1:6 EtAc/Hexane), the mixture was used directly for next step without further purification.

To the solution of 5-amino-1H-indole-2-carboxylic acid (1.32 g, 7.49 mmol) in 50 ml of 1:4 of 0.5 M Na₂HPO₄, pH 8.0 / DMA at 0°C was added drop by drop the above prepared NHS ester solution in 1 h. After addition, the mixture was continued stirred at 4°C for 1 h then RT for 1h. The mixture was concentrated and purified on SiO₂ chromatography eluted with THF/Toluene/Acetic acid (1:4:0.02% to 1:2:0.02%) to afford the title product (1.62 g, 70%). ¹H NMR (DMF-d₇) 12.80 (br, 0.8 H), 11.66 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 7.14 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 3.20 (t, 2H, J = 6.9 Hz), 2.72 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR 169.53, 163.45, 135.24, 133.38, 130.12, 127.99, 119.13, 113.10, 112.27, 108.04, 36.88, 30.60. MS m/z⁺ 309.20 (M-1).

EXAMPLE 6

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-(methylidisulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid (DC107SMe)

To a solution of DC101SMe ((S)-N-(2-(1-(chloromethyl)-5-hydroxy-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indole-3-carbonyl)-1H-indol-5-yl)-3-(methylidisulfanyl)propanamide, 100 mg 0.19 mmol) in 10 ml of DMA was added DIPEA (35 µl, 0.20 mmol). After stirred under Ar for 3 min., 32.0 mg (0.20 mmol) of carbonyldiimidazole was added. The mixture was stirred for 2 hours and TLC showed all DC101SMe was consumed, then fresh prepared 3-aminobenzenesulfonate diisopropylethylamine salt (65 mg, 0.21 mmol) was added. The mixture was stirred under Ar for 24 h and HPLC showed the reaction completed to form DC107SMe [(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-(methyl-isulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-

carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid]. The mixture was concentrated to ~ 5 ml with oil pump and used directly for next step without further purification.

5 EXAMPLE 7

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid (DC107)

To the above concentrated solution was added 60 mg (0.62 mmol) of TCEP in 10 ml of 1:1 DMA/0.4 M NaH₂PO₄, pH 4.0. After stirred under Ar for 4 h, the mixture was concentrated and purified with C18 column eluted with from 90% of 0.01% acetic acid in DMA to 40% of 0.01% acetic acid in DMA. The fractions were pooled and evaporated to afford 94 mg (73%, two steps) of (S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid (DC107). ¹H NMR (DMF-d₇) 11.63 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.33 (s, 2H), 7.93 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 7.58 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.25 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 4.87 (dd, 1H, J = 8.7, 11.0 Hz), 4.74 (dd, 1H, J = 2.3, 10.9 Hz), 4.32 (m, 1H), 4.12 (dd, 1H, J = 3.0, 11.0 Hz), 3.93 (dd, 1H, J = 8.4, 11.2 Hz), 3.21 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.70 (t, 2H, J = 7.1 Hz); ¹³C NMR 169.55, 161.30, 155.46, 150.21, 143.45, 134.22, 133.37, 132.54, 131.35, 130.31, 128.38, 127.95, 123.78, 123.72, 123.48, 123.33, 121.41, 118.88, 115.90, 112.88, 112.35, 106.44, 101.38, 55.95, 48.60, 42.67, 36.90, 25.01. MS m/z- 676.90 (M-H), ε_{340 nm} = 19025 M⁻¹cm⁻¹.

Conjugation of DC07 to monoclonal antibodies. huMy9-6 antibody that binds to the CD33 antigen preferentially expressed on the surface of human AML cells was selected for the conjugation of DC07.

EXAMPLE 8

Preparation of huMy9-6-SSNPB-DC07: a disulfide-linked conjugate

In the first step, the antibody was reacted with the modifying agent N-sulfosuccinimidyl 5-nitro-2-pyridyldithiobutanoate (SSNPB) to introduce nitropyridyldithio groups. A solution of huMy9-6 antibody at a concentration of 8.5 mg/mL in an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M sodium chloride, 2 mM

5 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), 3% dimethylacetamide (DMA), pH 6.5, was treated with a 7.5 fold molar excess of a solution of SSNPB (20 mM stock in DMA). The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min and purified over a Sephadex G25 pre-packed column that had been previously equilibrated into an aqueous buffer containing 0.1 M NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 6.5. The purified sample yielded 98% of product. A small aliquot of the modified antibody was treated with dithiothreitol to cleave the nitro-pyridyl disulfide and the released nitro-pyridine-2-thione was assayed spectrophotometrically: $\epsilon_{325\text{nm}} = 10,964 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{280\text{nm}} = 3,344 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for nitro-pyridine-2-thione, and $\epsilon_{280\text{nm}} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the antibody. An average of 5.0 nitro-pyridyldisulfide groups were linked per molecule of antibody.

15 The modified antibody was diluted to 2.0 mg/mL in the above buffer at pH 6.5 with 5% DMA and then treated with a solution of DC07 in DMA, with a drug excess of 2.5 drugs per linker. The conjugation mixture reacted at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was purified by passage through a Sephacryl S300 gel filtration column, that had been previously equilibrated in 20% DMA, 0.1 M NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 5.0. Fractions containing monomeric antibody-DC07 conjugate were pooled and dialyzed into 10 mM Citrate, 135 mM NaCl, pH 5.0. The final conjugate was assayed spectrophotometrically using the following extinction coefficients: $\epsilon_{340\text{nm}} = 38,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280\text{nm}} = 23,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the drug, and $\epsilon_{280\text{nm}} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the antibody. The conjugate contained 3.5 drugs per antibody.

EXAMPLE 9

Preparation of huMy9-6-SMCC-DC07: a thioether-linked conjugate

25 In the first step, the antibody was reacted with the modifying agent succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC). A solution of huMy9-6 antibody at a concentration of 8.5 mg/mL in an aqueous buffer containing 0.05 M potassium phosphate, 0.05 M sodium chloride and 2 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), 3 % DMA, pH 6.5 was treated with a 8.5 fold molar excess of a solution of SMCC (20 mM in DMA) at room temperature for 90 min. The modified antibody was purified over a Sephadex G25 pre-packed column that had been previously equilibrated into an aqueous buffer containing 0.1 M NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 6.5. The purified sample was assayed

5 spectrophotometrically ($\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) to calculate the concentration of antibody. The concentration of bound linker was determined by an established procedure that indirectly measures the amount of linker available for reaction with the thiol containing amino acid, cysteine. There were determined to be 6.0 linkers per antibody post
5 modification.

The modified antibody was diluted to 2.0 mg/mL in 0.1 M NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl, 5 % DMA, pH 6.5 and treated with 0.20 mM DC07 (2.5 mol DC07/ linker). The conjugation reaction was allowed to proceed at room temperature for 80 minutes. The reaction was then acidified with 5 % acetic acid and submitted to analysis using a HPLC system
10 equipped with an analytical size exclusion (SEC) column equilibrated in 20% DMA, 0.1 M NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl, pH 5.0 which allowed for the separation of antibody-drug conjugate from unreacted DC07. The eluent from the column was monitored for absorbance at 280 nm and 340 nm. The ratio of DC07 to antibody was determined spectrophotometrically to be 3.5. ($\epsilon_{340nm} = 38,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280nm} = 23,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the
15 drug, and $\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the antibody)

Calculation for Drug/Ab ratio from SEC analysis:

DC07 = $A_{340}/38000$

huMy9-6 = $[(A_{280} - (23000 * A_{340})) / 38000] / 206460$

20 Drug/Ab = DC07/My9-6

EXAMPLE 10

Biological results

• Cytotoxicity of DC07-SMe (Fig. 2) and DC1-SMe (Fig. 1D) towards Ramos and HL60/S
25 cells has been measured *in vitro* with 5-day exposure. Results are given in Fig. 6. IC50 are shown below.

Concentration (M)		
Cell line	DC1-SMe	DC07-SMe
HL60/s	$3.6 \times 10^{-11}\text{M}$	$5 \times 10^{-11}\text{M}$
Ramos	$6.2 \times 10^{-11}\text{M}$	$1.2 \times 10^{-10}\text{M}$

• Cytotoxicity of DC1-SPy and DC07-SPy towards Ramos and HL60 cells has been measured. Results are given in Fig. 7 and IC50 are shown below.

52

DC1-SPy :

Cell line	IC ₅₀ (M)
Ramos	7.5 x 10 ⁻¹²
HL60	7.5 x 10 ⁻¹²

DC07-SPy :

Cell line	IC ₅₀ (M)
Ramos	2.8 x 10 ⁻¹¹
HL60	2.0 x 10 ⁻¹¹

▪ Cytotoxicity of DC08-SSPy towards Namalwa and Ramos cells has been measured. Results are given in Fig. 8 and IC50 are shown below.

5

Cell line	IC ₅₀ (M)
Namalwa	4.2 x 10 ⁻¹⁰ M
Ramos	4.2 x 10 ⁻¹⁰ M

▪ Cytotoxicity of MY9-6-DC07 (disulfide linked) towards antigen positive Kara and antigen negative Ramos cells has been measured. Results are given in Fig. 10 and IC50 are shown below.

10

Cell line	IC ₅₀ (M)
Kara	8.006 x 10 ⁻¹³ M
Ramos	1.015 x 10 ⁻⁹ M

▪ Cytotoxicity of huC242-DC07 (thioether linked) towards antigen positive COLO 205 and antigen negative A-375 cells has been measured. Results are given in Fig. 11 and IC50 are shown below.

Cell line	IC ₅₀ (M)
COLO 205	3.5 x 10 ⁻¹¹ M
A-375	1.3 x 10 ⁻⁹ M

15

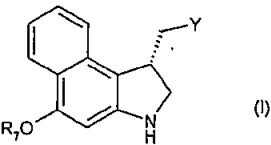
Certain patents and printed publications have been referred to in the present disclosure, the teachings of which are hereby each incorporated in their respective entireties by reference.

While the invention has been described in detail and with reference to specific embodiments thereof, it will be apparent to one of skill in the art that various changes and modifications can be made thereto without departing from the spirit and scope thereof.

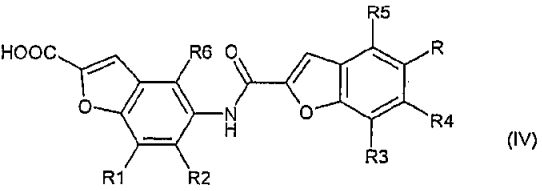
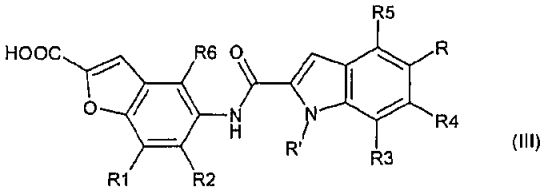
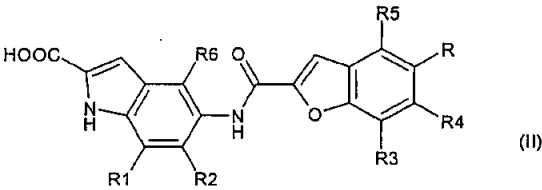
45
CLAIMS

1. A prodrug comprising an analog of CC-1065 in which the phenolic group of the alkylating portion of the molecule is protected by a protecting group increasing water-solubility of said prodrug, and wherein said prodrug further comprises a linker capable of conjugating said prodrug to a cell binding agent, characterized in that said protecting group is a sulfonic acid containing carbamate.

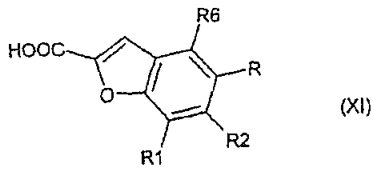
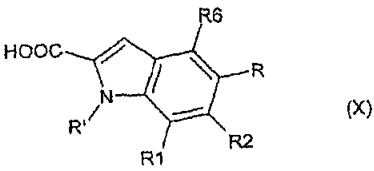
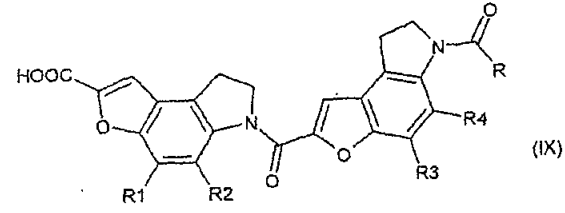
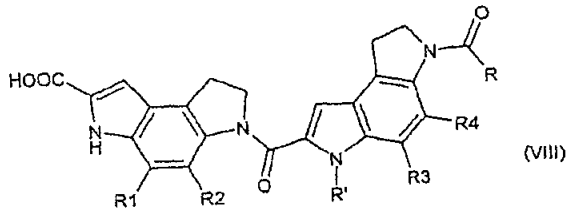
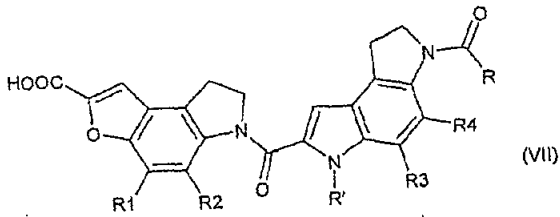
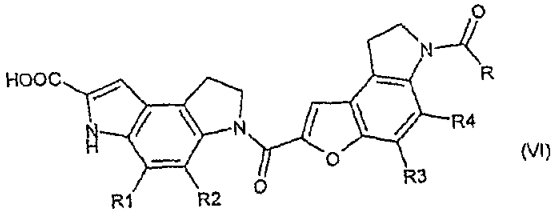
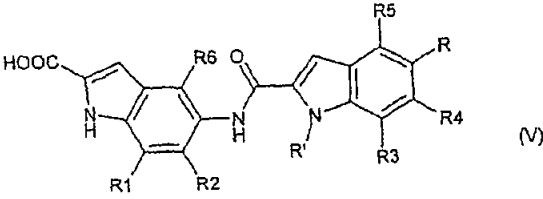
2. A prodrug according to claim 1, wherein the analog of CC-1065 is selected from the group consisting of analogs formed from a first subunit of formula (I) covalently linked to a second subunit of the formula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) or (XI) via an amide bond from the secondary amino group of the pyrrole moiety of the first subunit to the C-2 carboxyl of the second subunit, wherein the formula (I) is as follows:



15 wherein the formulae (II)-(XI) are as follows:



46

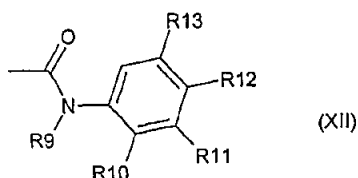


in which Y represents a leaving group selected from a halide (fluoride, chloride, bromide or iodide), methanesulfonate, para-toluenesulfonate, trifluoromethane sulfonate, mono nitro or dinitro phenolate;

wherein R, R', R₁-R₆ are each independently hydrogen, C₁-C₃ linear alkyl, methoxy, hydroxyl, primary amino, secondary amino, tertiary amino, or amido or a linker that provides for linkage of the prodrug to a cell binding agent, provided that at least one of R, R', R₁-R₆ is a linker,

and wherein R₇ is said sulfonic acid containing carbamate protecting group, or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

3. The prodrug of claim 2, wherein R₇ is a sulfonic acid containing phenyl carbamate of general formula XII:



where R₉ is H or a branched, cyclic or linear alkyl, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ are identical or different with at least one being a -X-SO₃⁻M⁺ group with M⁺ being H⁺ or the cation deriving from an atom of the IA group, and X being a direct link, or a spacer chosen from C1 to C4 linear or branched alkyl, alkenyl or alkynyl, an -Oalkyl-, -Salkyl- and aminoalkyl and the other R₁₀, R₁₁, R₁₂ or R₁₃ being H, a C₁-C₆ branched or linear alkyl, -Oalkyl, -Salkyl, hydroxyl, primary amino, secondary amino, or amido, halide, nitro, azido.

4. The prodrug according to claim 3, wherein R₉=H.

5. The prodrug according to claim 3 or 4, wherein one of R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃= -X-SO₃⁻M⁺ and the others are H.

6. The prodrug according to claims 2 to 5, wherein R', R₁-R₆ are hydrogen and R is a linker.

7. The prodrug according to anyone of the preceding claims, wherein said linker comprises a thiol, sulfide or a disulfide bond containing substituent.

8. The prodrug according to anyone of the preceding claims, wherein said linker comprises a polyethylene glycol of the formula $-(OCH_2CH_2)_n-$, wherein n is an integer from 1 to 2000.

9. The prodrug according to anyone of the preceding claims, wherein said linker group is of formula:

10 $-G-D-(Z)_p-S-Z'$

where

G is a single or double bond, $-O-$, $-S-$ or $-NT-$;

15 D is a single bond or $-E-$, $-E-NT-$, $-E-NT-F-$, $-E-O-$, $-E-O-F-$, $-E-NT-CO-$, $-E-NT-CO-F-$, $-E-CO-$, $-CO-E-$, $-E-CO-F-$, $-E-S-$, $-E-S-F-$, $-E-NT-C-S-$, $-E-NT-CS-F-$;

where T is H or a C_1-C_6 branched or linear alkyl;

where E and F are the same or different and are independently chosen from linear or branched $-(OCH_2CH_2)_i$ Alkyl $(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl(OCH_2CH_2)_i$ Alkyl $-$,

20 $-(OCH_2CH_2)_i-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ Cycloalkyl $(OCH_2CH_2)_j-$,
 $-(OCH_2CH_2)_i$ Heterocyclic $(OCH_2CH_2)_j-$, $-(OCH_2CH_2)_i$ Aryl $(OCH_2CH_2)_j-$,
 $-(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaryl $(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i$ Alkyl $(OCH_2CH_2)_j-$,
 $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i$ Cycloalkyl $(OCH_2CH_2)_j-$,
 $-Alkyl(OCH_2CH_2)_i$ Heterocyclic $(OCH_2CH_2)_j-$, $-Alkyl-(OCH_2CH_2)_i$ Aryl $(OCH_2CH_2)_j-$,
25 $-Alkyl(OCH_2CH_2)_i$ Heteroaryl $(OCH_2CH_2)_j-$, $-Cycloalkyl-Alkyl-$, $-Alkyl-Cycloalkyl-$,
 $-Heterocyclic-Alkyl-$, $-Alkyl-Heterocyclic-$, $-Alkyl-Aryl-$, $-Aryl-Alkyl-$,
 $-Alkyl-Heteroaryl-$, $-Heteroaryl-Alkyl-$;

where i and j, identical or different are integers and independently chosen from 0, 1 to 2000;

30

Z is linear or branched $-Alkyl-$;

p is 0 or 1;

Z' represents H, a thiol protecting group such as COR, R₂₀ or SR₂₀, wherein R₂₀ represents H, methyl, Alkyl, optionally substituted Cycloalkyl, aryl, heteroaryl or heterocyclic.

5 10. The prodrug according to claim 9, wherein G is a single bond or -NT-.

11. The prodrug according to claim 9 or 10, wherein G is -NT-.

12. The prodrug according to claim 9, 10 or 11, wherein D is -CO-E-.

10

13. The prodrug according to anyone of claims 9 to 12, wherein E is a linear or branched -Alkyl-.

14. The prodrug according to anyone of claims 9 to 13, wherein p is 0.

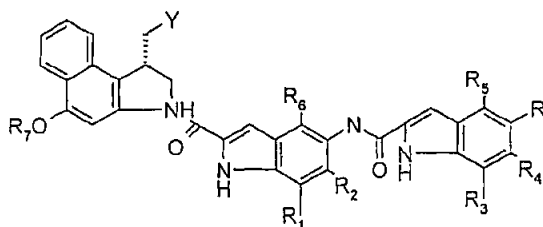
15

15. The prodrug according to anyone of claims 9 to 14, wherein Z' is H or SR₂₀, wherein R₂₀ represents Alkyl or heteroaryl.

16. The prodrug according to anyone of claims 1 to 15, wherein said linker is chosen
 20 from (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mSZ,
 (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ,
 (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄
 (CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ,
 (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ,
 25 (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m
 C(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m
 (OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mSZ,
 (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCHMeSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m
 CMe₂SZ or (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, wherein: Z represents H, a thiol
 30 protecting group such as Ac, R₈ or SR₈, wherein R₈ represents methyl, linear alkyl,
 branched alkyl, cyclic alkyl, simple or substituted aryl or heterocyclic, and m represents an
 integer of 0 to 10, n represents an integer of 0 to 2000, p represents an integer of 0 to 10.

17. The prodrug according to anyone of claims 1 to 16, wherein said linker is chosen from $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$, $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{Me})_2\text{SH}$, $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{SSCH}_3$, $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SH}$, $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_nC(\text{Me})_2\text{SSCH}_3$ and $(\text{CH}_2)_p\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SSMe}$.

18. The prodrug according to anyone of claims 1 to 17, wherein it consists of formula:



wherein Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R are defined as in claims 2 to 17, and where R is a linker as defined in claims 7-17,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

19. The prodrug according to anyone of the preceding claims, which is:

(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxy-sulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-methyldithiopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide

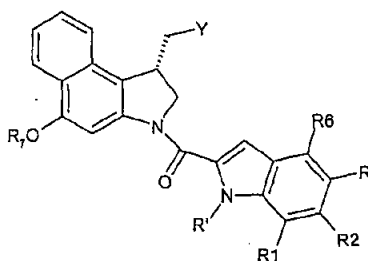
(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethylphenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-(2-pyridyldithio)-propanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethylphenyl)aminocarbonyl-oxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropionyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

(S)-N-[2-[(1-chloromethyl)-1,2-dihydro-5-[(3-hydroxysulfonylmethyl-phenyl)aminocarbonyloxy]-3H-benz(e)indol-3-yl]carbonyl]-1H-indol-5-yl]-5-[(3-mercaptopropanoyl)-amino]-1H-indole-2-carboxamide,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

20. The prodrug according to anyone of claims 1 to 17, wherein it consists of formula:



10

wherein Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ and R are defined as in claims 2 to 17, and where R is a linker as defined in claims 7-17,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates,

15 diastereomers or enantiomers.

21. The prodrug according to anyone of claims 1 to 17, 20 which is:

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid,

20

(S)-3-((1-(chloromethyl)-3-(5-(3-(methylidisulfanyl)propanamido)-1H-indole-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indol-5-yloxy)carbonylamino)benzenesulfonic acid,

or their pharmaceutically acceptable salts, hydrates, or hydrated salts, or the polymorphic crystalline structures of these compounds or their optical isomers, racemates, diastereomers or enantiomers.

25

22. A prodrug conjugate comprising a cell binding agent linked to one or more of the prodrugs according to anyone of the preceding claims through a linking group.

61

23. The prodrug conjugates of claim 22, wherein said cell binding agents are chosen from antibodies and fragments thereof, interferons, lymphokines, vitamins, hormones and growth factors

5 24. The prodrug conjugates of claim 22 or 23, wherein said cell binding agents are antibodies or fragments thereof.

25. The prodrug conjugate according to claim 22, 23 or 24, wherein the linking group comprises the linker linked to a function reactive towards thiol, sulfide or disulfide.

10

26. A pharmaceutical composition comprising the prodrug according to anyone of claims 1 to 21 and a pharmaceutically acceptable carrier.

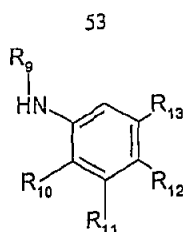
15 27. A pharmaceutical composition comprising the conjugate according to anyone of claims 22 to 25 and a pharmaceutically acceptable carrier.

28. Use of a prodrug according to anyone of claims 1 to 21 for the preparation of a medicament for treating cancer.

20 29. Use of a conjugate according to anyone of claims 22 to 25 for the preparation of a medicament for treating cancer.

25 30. Process of preparation of a compound according to anyone of claims 1 to 21 comprising the step of protecting the phenolic group of the alkylating portion of the corresponding analog of CC-1065 by a sulfonic acid containing carbamate function.

31. Process according to claim 30, wherein this reaction is carried out with CDI/DMA (carbonyldiimidazole/dimethylamine) and the corresponding amino-phenylsulfonate derivative of formula:



where R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ are defined as in claim 3.

32. The process of preparation according to claim 30 or 31, which further comprises
5 the step of hydrolyzing the obtained product.

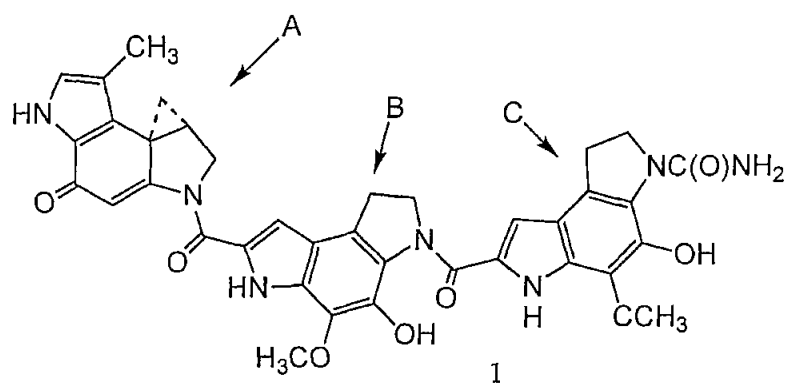
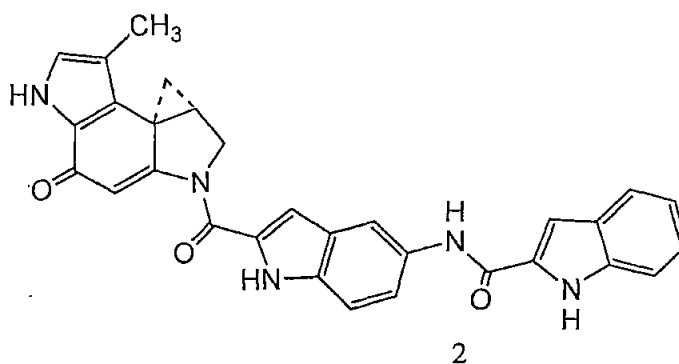
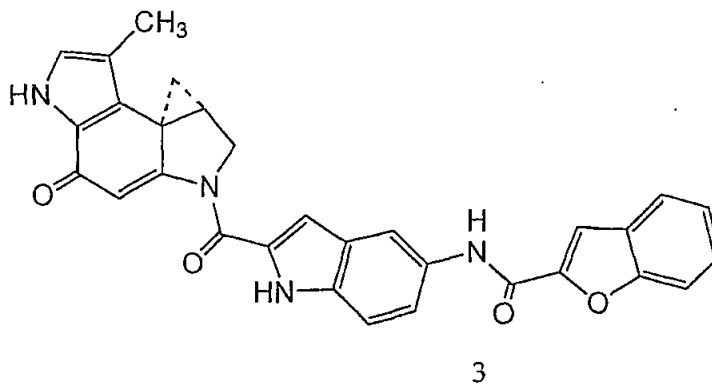
33. The process according to anyone of claims 30 to 32, which further comprises the
step of isolating the desired product.

10 34. Process of preparation of a conjugate according to anyone of claims 22 to 25
comprising the step where an analog of CC-1065 as defined in anyone of claims 1 to 21
which comprises a sulfide, disulfide or thiol group is reacted with a cell binding agent
comprising a function reactive towards sulfide, disulfide or thiol so that the analog and the
cell binding agent are linked together via a covalent sulphide or disulfide bond.

15

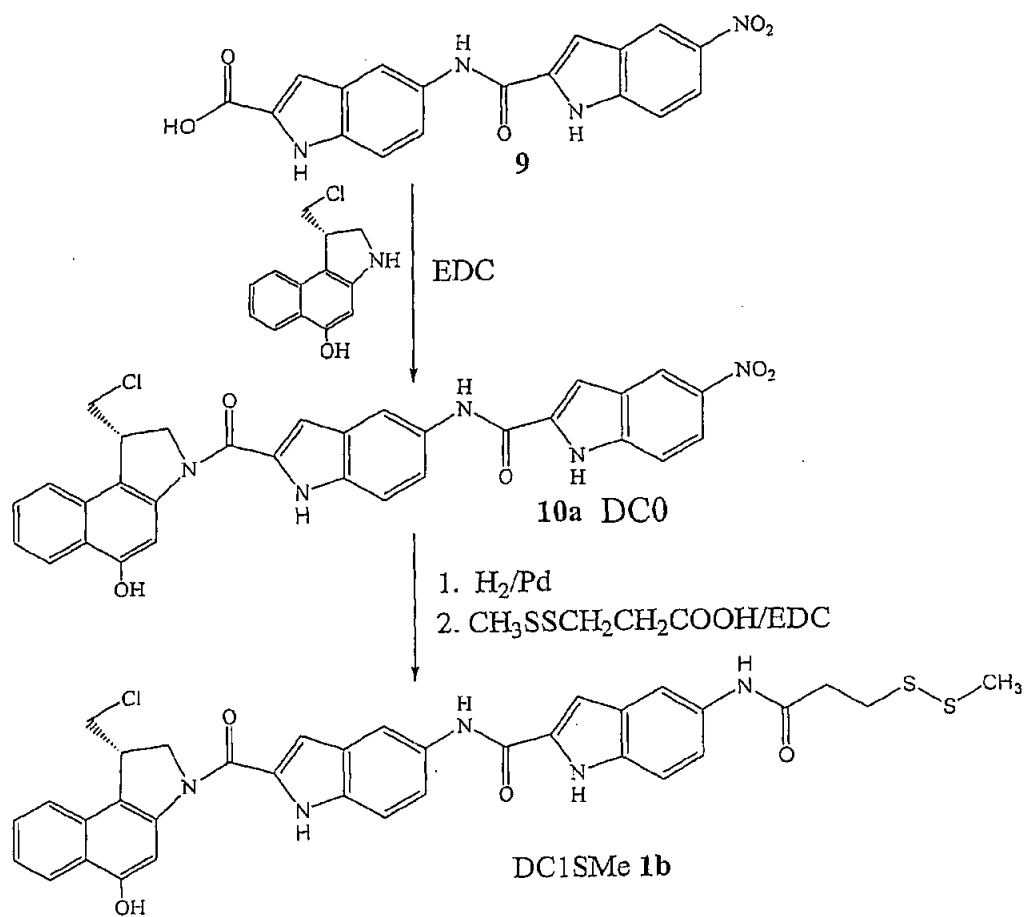
1/14

FIGURE 1

FIG. 1A
PRIOR ARTFIG. 1B
PRIOR ARTFIG. 1C
PRIOR ART

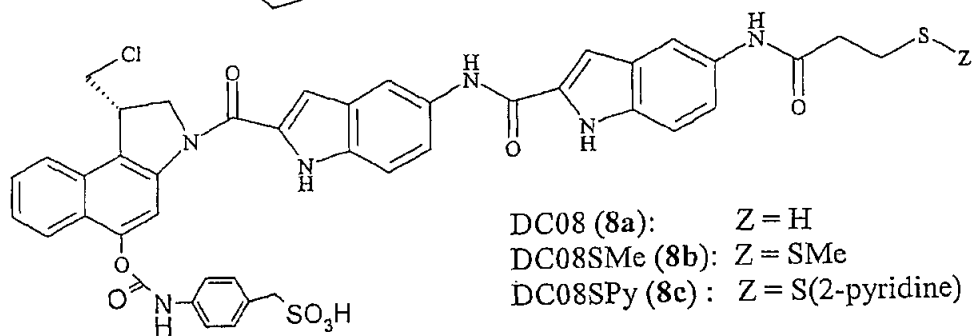
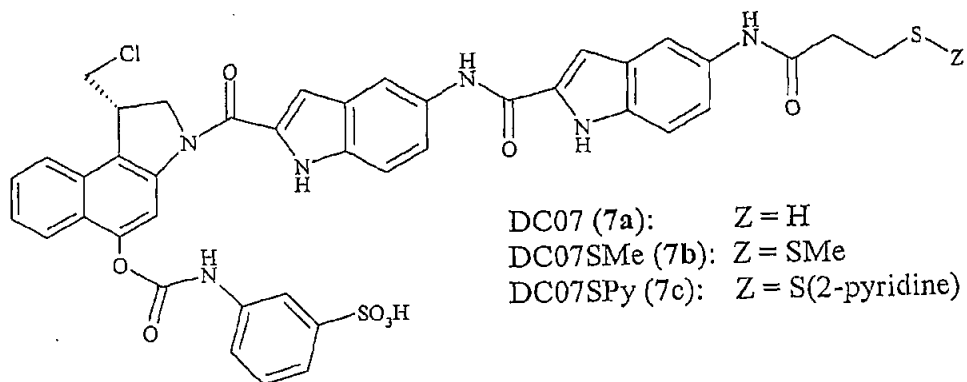
2/14

FIGURE 1D



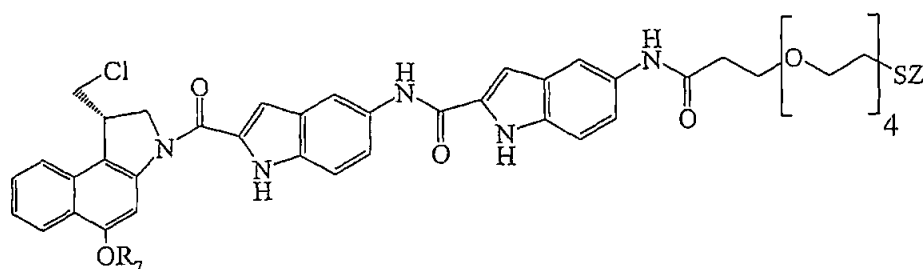
3/14

FIGURE 2

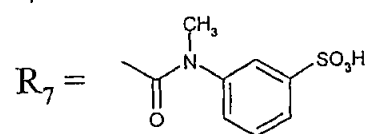


4/14

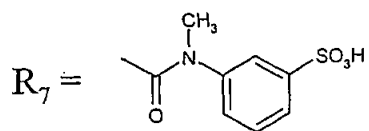
FIGURE 3

DC5 (5a) Z = H $R_7 = H$ DC5SMe (5b) Z = SMe $R_7 = H$

DC09 (9a) Z = H

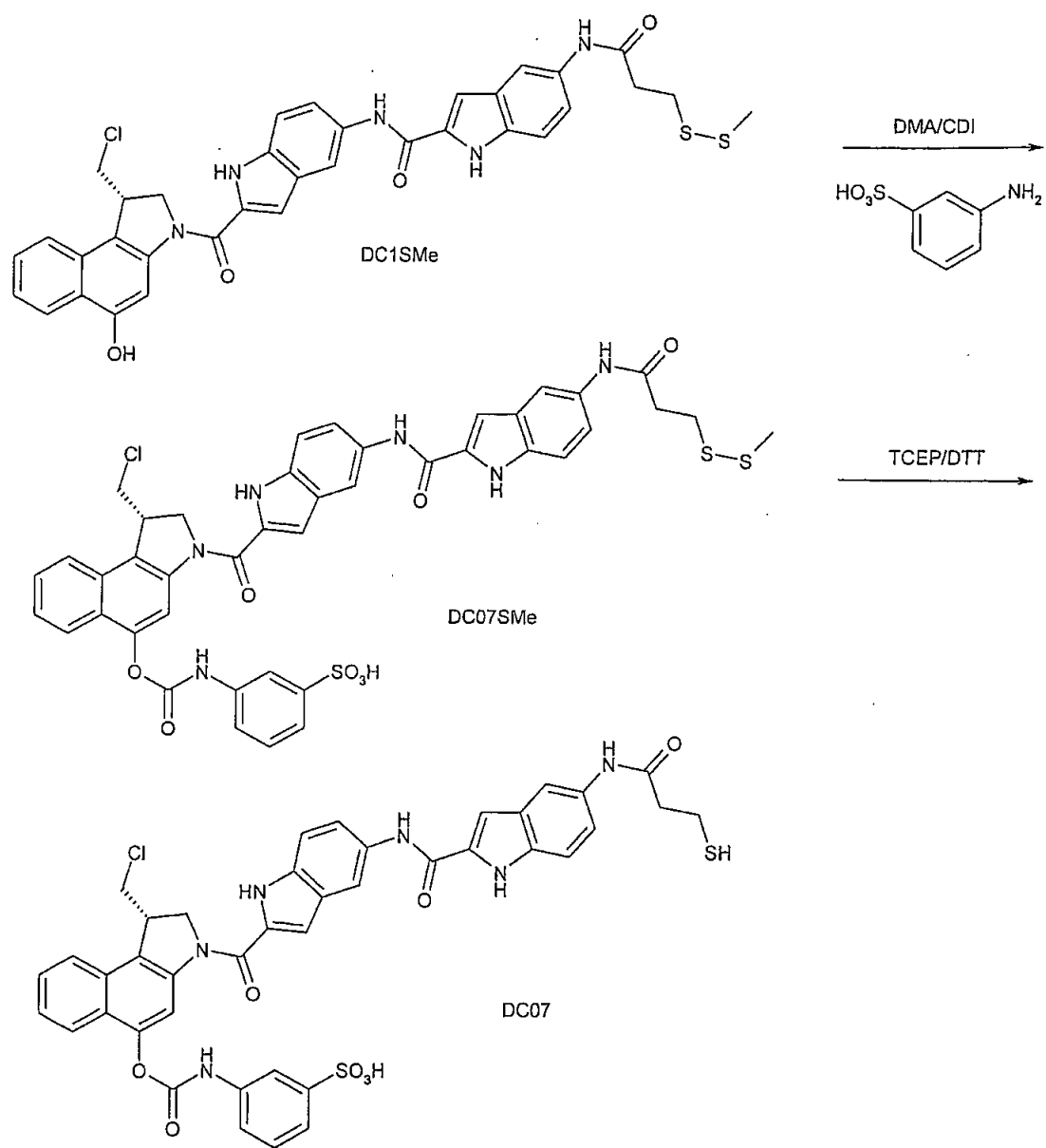


DC09SMe (9b) Z = SMe



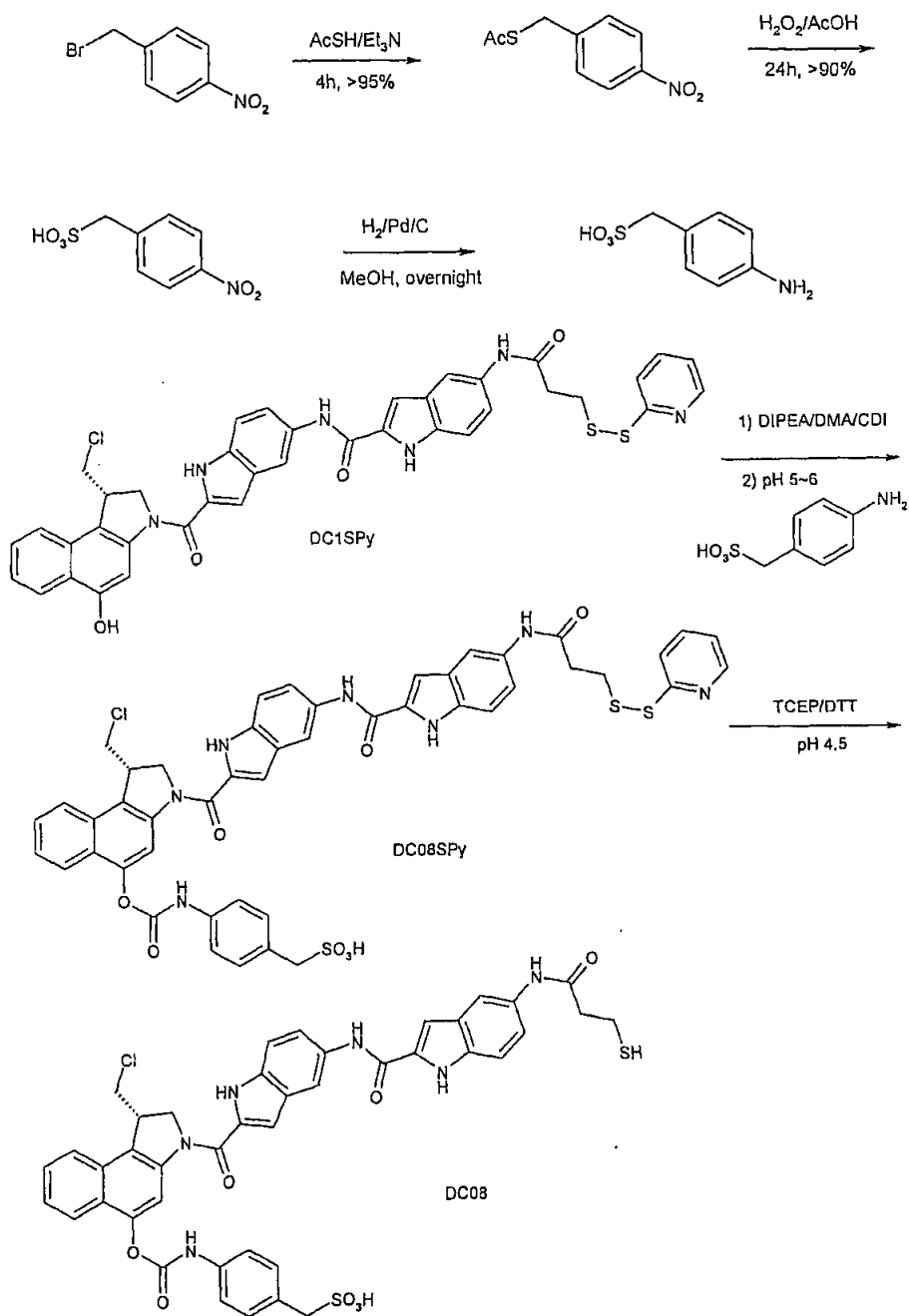
5/14

FIGURE 4A



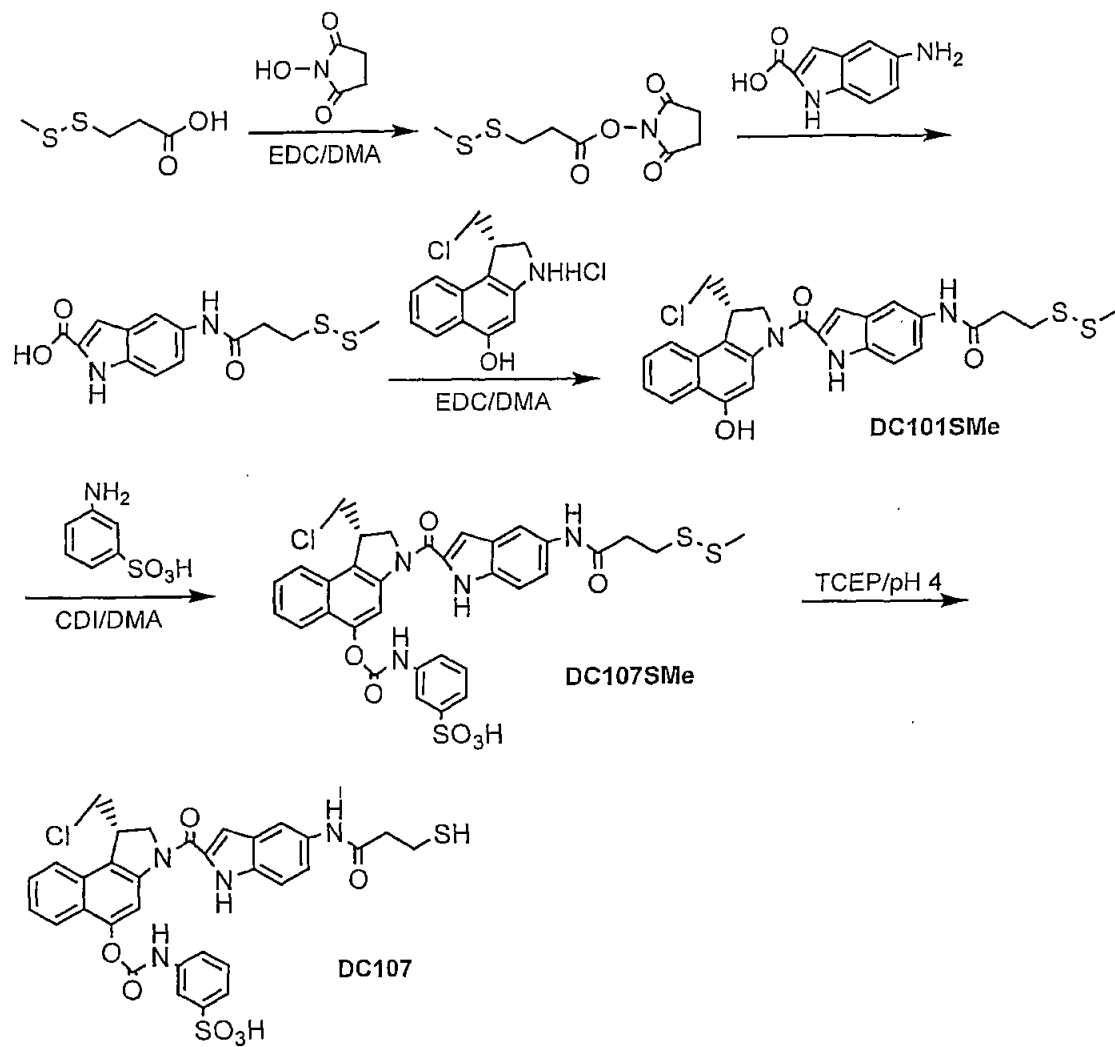
6/14

FIGURE 4B



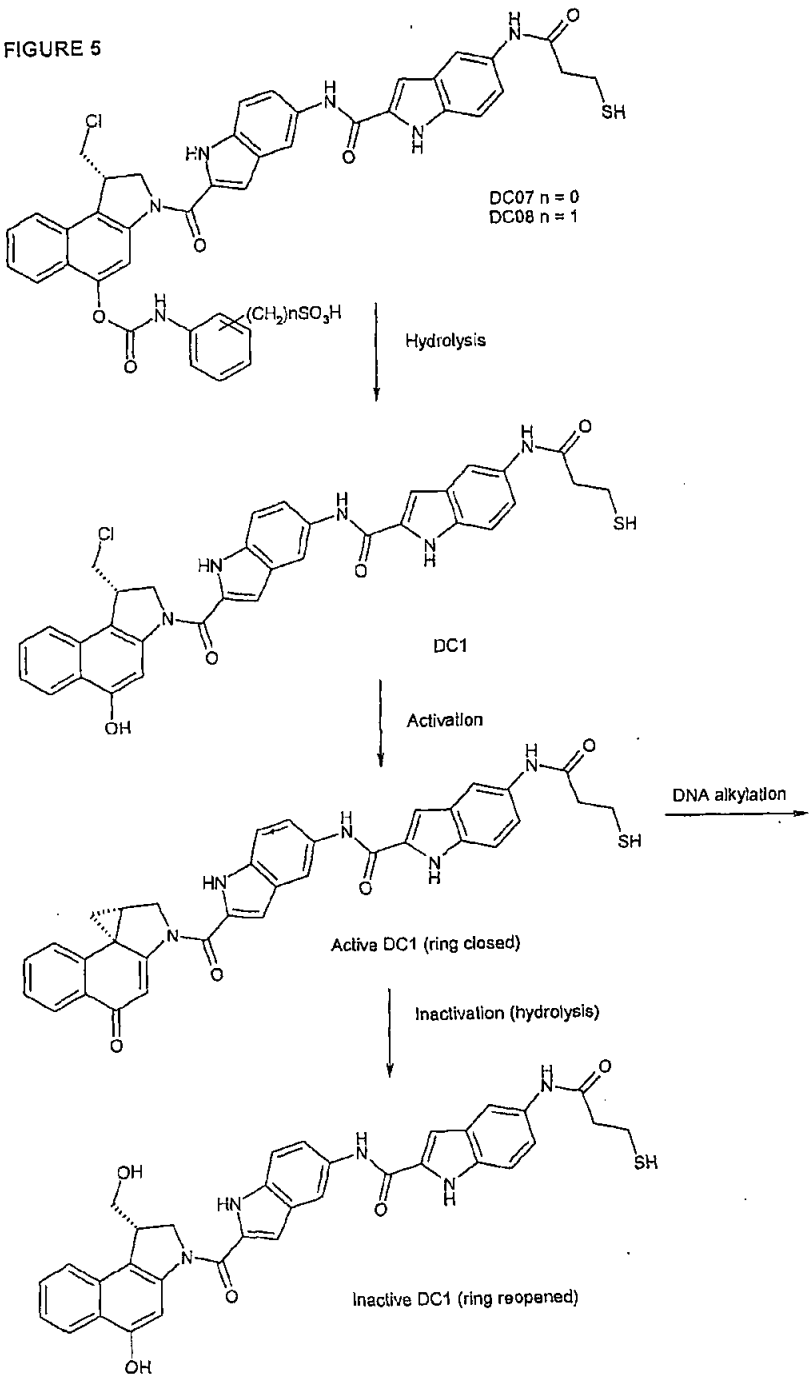
7/14

FIGURE 4C



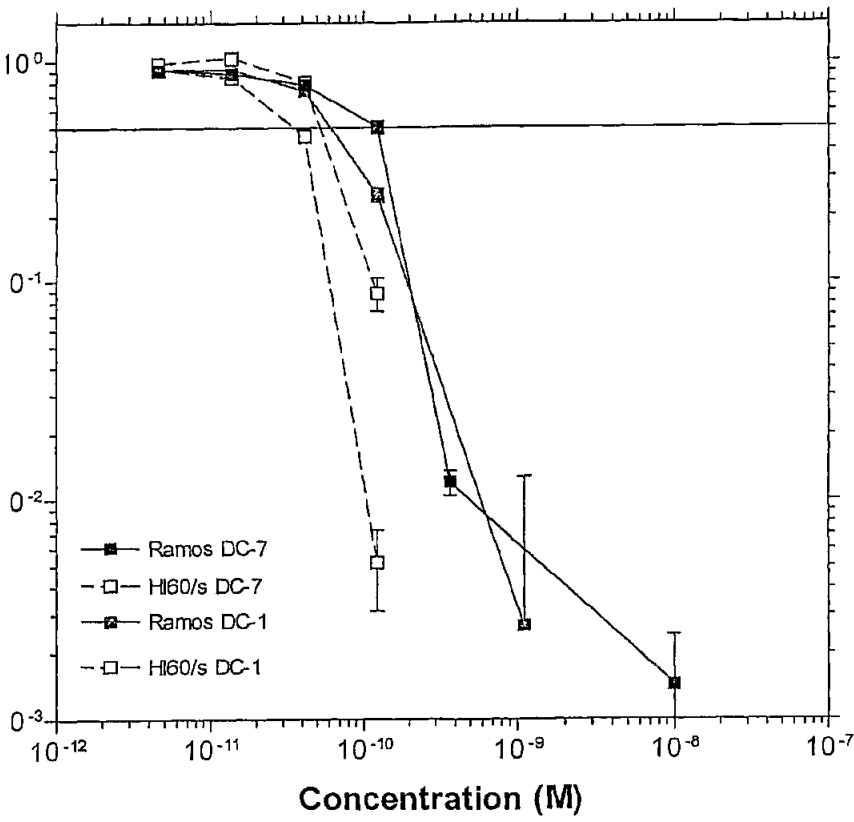
8/14

FIGURE 5



9/14

FIGURE 6

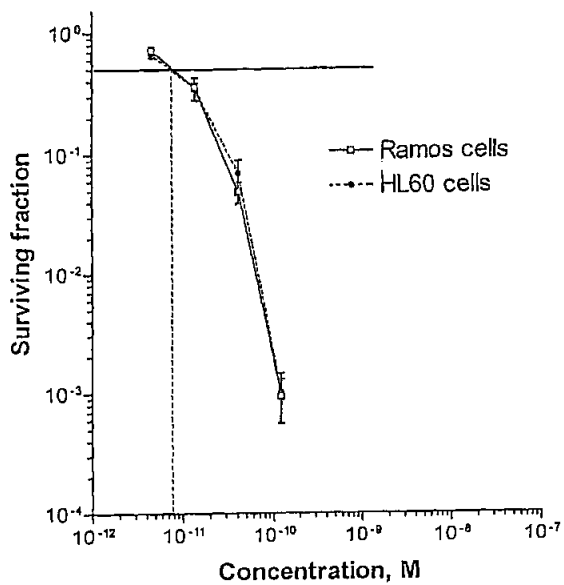


10/14

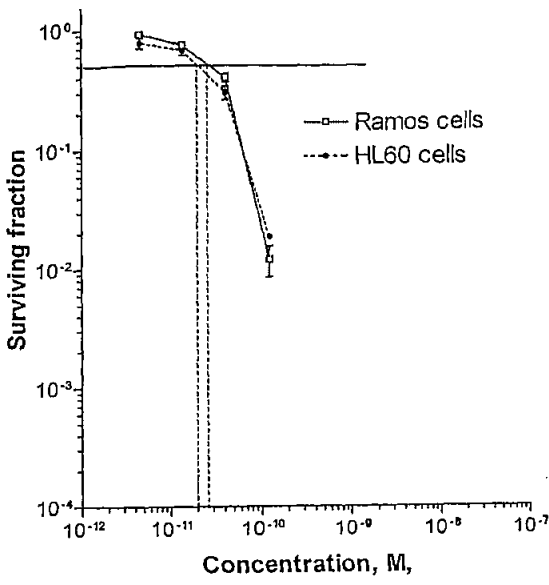
FIGURE 7

DC1SPY

DC07SPy



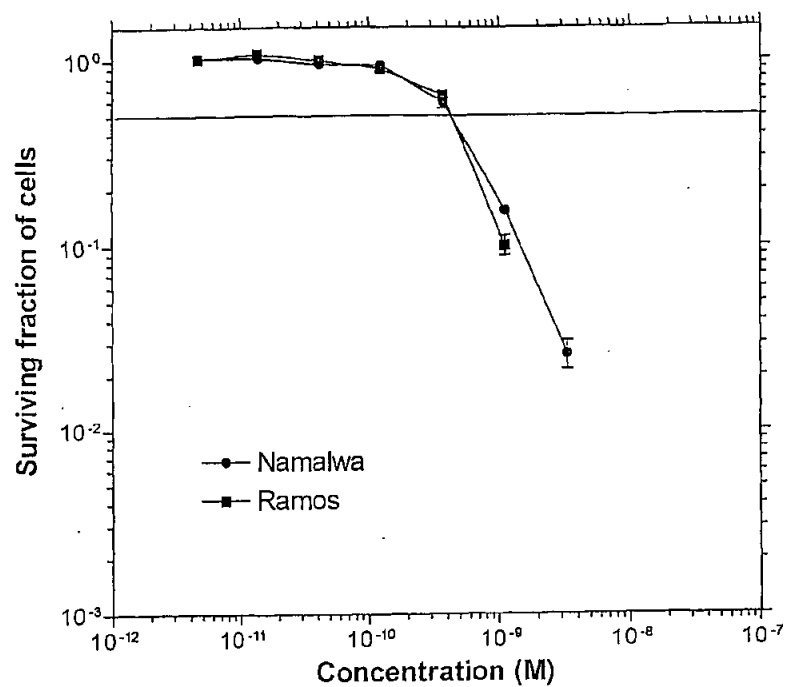
Cell Line	IC ₅₀ (M)
Ramos	7.5 x 10 ⁻¹²
HL60	7.5 x 10 ⁻¹²



Cell line	IC ₅₀ (M)
Ramos	2.8 x 10 ⁻¹¹
HL60	2.0 x 10 ⁻¹¹

11/14

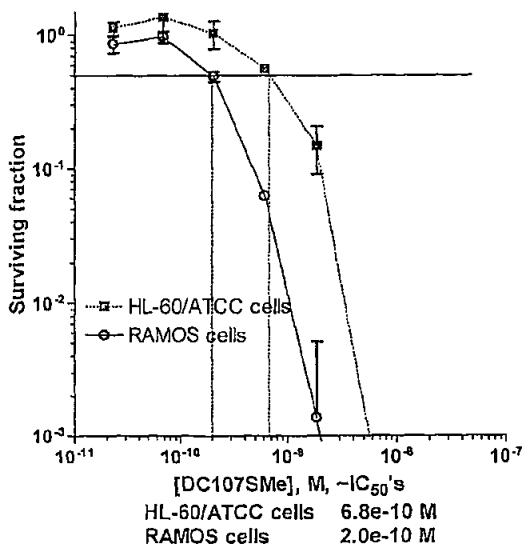
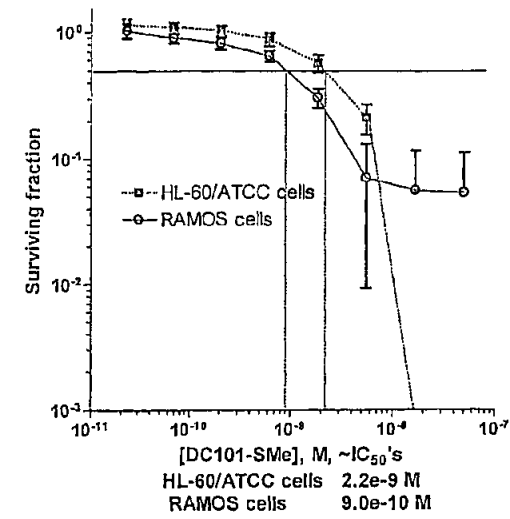
FIGURE 8



IC50 values	
Cell line	DC08-SSpy
Ramos	$4.2 \times 10^{-10}M$
Namalwa	$4.2 \times 10^{-10}M$

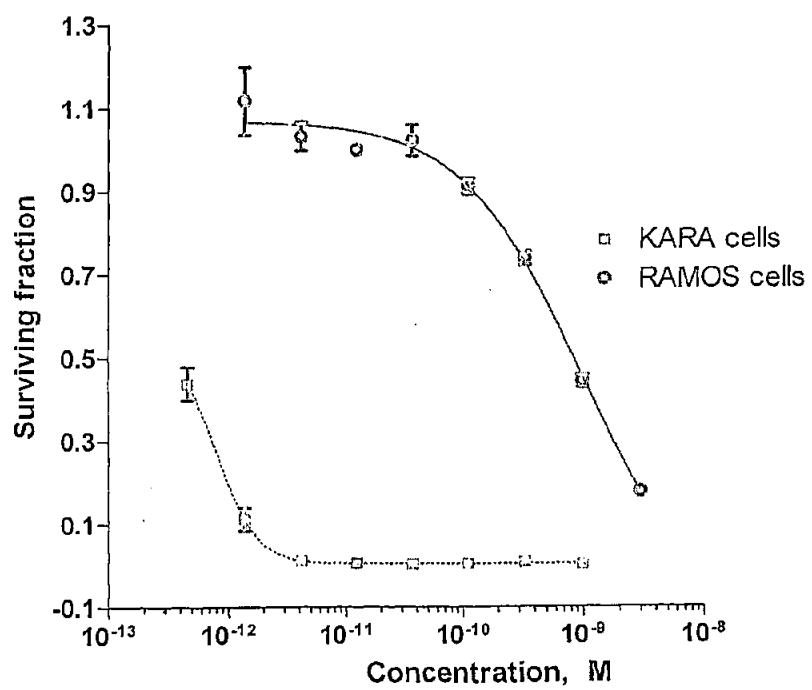
12/14

Figure 9



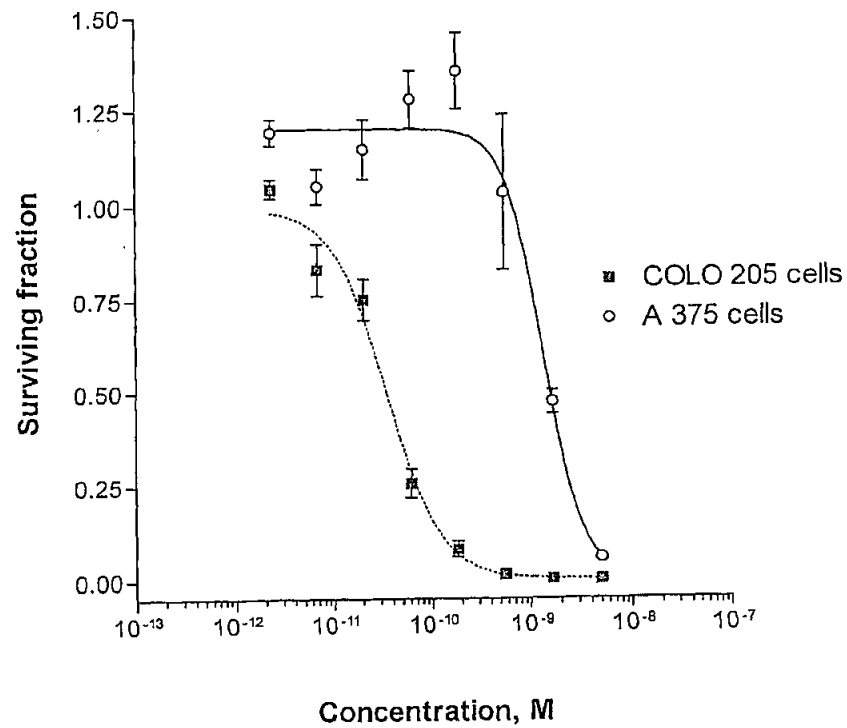
13/14

FIGURE 10



14/14

FIGURE 11



	IC ₅₀
COLO 205	3.50 x 10 ⁻¹¹ M
A 375	1.36 x 10 ⁻⁹ M

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN
MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



PCT

(10) Número de publicación
internacional
WO 2007/102069 A1

(43) Fecha de publicación internacional
13 Septiembre 2007 (13.09.2007)

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
C07D 209/60 (2006.01) A61K 31/4439 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/IB2007/000521

(22) Fecha de presentación internacional:
6 Marzo 2007 (06.03.2007)

(25) Idioma de la presentación:
Inglés

(26) Idioma de la publicación:
Inglés

(30) Datos de prioridad:
06290379.4 7 Marzo 2006 (07.03.2006) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto EE.UU.): **SANOPI-AVENTIS** [FR/FR]; 174, Avenue De France, F-75013 Paris (FR). **CHARI, Ravi** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (solamente para EE.UU.): **ZHAO, Robert** [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(74) Agente: **COLOMBET, Alain et al.**; CABINET LAVOIX, 2, Place D'estienne D'orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- Con informe de búsqueda internacional.
- Antes de expirar el plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, se volverá a publicar si se reciben las modificaciones.

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, se hace referencia a "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada índice regular del Boletín PCT.

(54) Título: PROFARMACOS MEJORADOS DE ANALOGOS DE CC-1065

(57) Resumen: Profármacos de análogos del antibiótico CC-1065 antitumoral que tiene un grupo protector escindible que contiene un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo, en los que el grupo protector confiere mayor solubilidad en agua respecto al profármaco, y en los que el profármaco también tiene un resto tal como un sulfuro o un disulfuro, que pueden conjugarse a un reactivo de unión a células tal como un anticuerpo. El uso terapéutico de tales conjugados profármacos se describe también; tales profármacos de agentes citotóxicos tienen uso terapéutico porque pueden liberar profármacos citotóxicos a una población celular específica para conversión enzimática a fármacos citotóxicos de una manera dirigida.

PROFARMACOS MEJORADOS DE ANALOGOS DE CC-1065

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos profármacos de agentes citotóxicos y a sus usos terapéuticos. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos profármacos de agentes citotóxicos que son análogos de CC-1065 y que comprenden tanto un resto para enlace químico a un agente de unión a células como un grupo protector que se escinde *in vivo*. Los profármacos pueden enlazarse químicamente a agentes de unión a células para proporcionar agentes terapéuticos capaces de ser activados y liberados *in vivo*, y ser suministrados a poblaciones celulares específicas de una manera dirigida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Han aparecido muchos informes que están encaminados a dirigir a células tumorales conjugados de fármacos-anticuerpos monoclonales {Sela et al, en *Immunoconjugates*, pp. 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, en *Targeted Drugs*, pp. 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, en *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, en *Antibody Mediated Delivery Systems*, pp. 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz y K.Krauer, 2 *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R. V. J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, en *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; e I. Ojima et al eds, American Chemical Society 2001}. Se han conjugado fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, calicheamicina y maitansinoides a una variedad de anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas de fármaco se enlazaron a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula portadora intermedia, tal como albúmina sérica {Garnett et al, 46 *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al 23, *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al, 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)}, dextrano {Hurwitz et al, 2 *Appl. Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al., 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al, 46 *Cancer Res.* 4886-4891 (1986); y Shoval et al, 85 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 8276-8280 (1988)}, o ácido poli(glutámico) {Tsukada et al, 73 *J. Natl. Canc. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al, 27 *J. Med. Chem.* 1602-1607 (1984); Tsukada et al., 52 *Br. J. Cancer* 111-116 (1985)}.

Actualmente está disponible una amplia serie de enlazadores para la preparación de tales inmunoconjugados, que incluyen tanto enlazadores escindibles como no escindibles. Sin embargo, pruebas de toxicidad *in vitro* han revelado que los conjugados anticuerpo-fármaco alcanzan pocas veces la misma potencia citotóxica que los fármacos libres no conjugados. Esto ha sugerido que los mecanismos por los que las moléculas de fármaco se liberan de los anticuerpos conjugados son muy ineficaces. Los primeros trabajos en el área de las inmunotoxinas mostraron que los conjugados formados a través de puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas proteicas catalíticamente activas eran más citotóxicos que los conjugados que contenían otros enlazadores {Lambert et al, 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert et al., en *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48 *Cancer Res.* 2610-2617 (1988)}. Esta citotoxicidad mejorada se atribuyó a la elevada concentración intracelular de glutatión reducido que contribuye a la escisión eficaz del enlace disulfuro entre la molécula de anticuerpo y la toxina. Los maitansinoides y calicheamicina fueron los primeros ejemplos de fármacos altamente citotóxicos que habían sido enlazados a anticuerpos monoclonales a través de enlaces disulfuro. Se ha demostrado que anticuerpos conjugados de estos fármacos poseen potencia elevada *in vitro* y actividad antitumoral excepcional en modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones {R. V. J. Chari et al., 52 *Cancer Res.*, 127-131 (1992); C. Liu et al., 93, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8618-8623 (1996); L.M. Hinman et al., 53, *Cancer Res.*, 3536-3542 (1993); y P.R. Hamann et al, 13, *BioConjugate Chem.*, 40-46 (2002)}.

Un candidato atractivo para la preparación de tales conjugados citotóxicos es CC-1065, que es un potente antibiótico antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es alrededor de 1000 veces más potente *in vitro* que fármacos anticancerígenos comúnmente usados tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina {B.K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, **42**, 3532-3537 (1982)}.

La molécula de CC-1065 consiste en 3 restos de pirroloindol sustituidos unidos por enlaces amida. La subunidad "A" tiene un anillo ciclopropilo que contiene los únicos carbonos asimétricos de la molécula. Aunque solamente la configuración relativa de estos carbonos está disponible de los datos de rayos X, se ha deducido la configuración absoluta como 3b-*R*, 4a-*S*, usando DNA como un reactivo quiral {Hurley, L. H. et al, 226 *Science* 843-844 (1984)}. Las subunidades "B" y "C" de CC-1065 son restos pirroloindol idénticos.

La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad enlazante a DNA o intercalante en DNA. Estas dos

actividades residen en partes separadas de la molécula. Así, la actividad alquilante está contenida en la subunidad de ciclopropapirrolloindol (CPI) y la actividad enlazante a DNA reside en las dos subunidades de pirroloindol (**Fig. 1A**).

Sin embargo, aunque CC-1065 tiene ciertas características atractivas como agente citotóxico tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones causó una hepatotoxicidad retardada que conduce a mortalidad el día 50 después de una sola dosis intravenosa de 12,5 $\mu\text{g/kg}$ {V. L. Reynolds et al., *J. Antibiotics*, **XXIX**, 319-334 (1986)}. Esto ha estimulado esfuerzos para desarrollar análogos que no causen toxicidad retardada, y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados sobre CC-1065 {M.A. Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, **31**, 590-603 (1988)}. En otra serie de análogos, el resto CPI se reemplazó por un resto ciclopropabencindol (CBI) {D.L. Boger et al., *J. Org. Chem.*, **55**, 5823-5833, (1990), D.L. Boger et al., *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, **1**, 115-120 (1991)}. Estos compuestos mantienen *in vitro* la elevada potencia del fármaco parental sin causar toxicidad retardada en ratones. Como CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor de DNA de un modo covalente para causar muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesin y Carzelesin, ha conducido a resultados decepcionantes {B.F. Foster et al., *Investigational New Drugs*, **13**, 321-326 (1996); I. Wolff et al., *Clin. Cancer Res.*, **2**, 1717-1723 (1996)}. Estos fármacos manifiestan efectos terapéuticos débiles a causa de su elevada toxicidad sistémica.

La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 se puede mejorar mucho cambiando la distribución *in vivo* mediante liberación dirigida al sitio del tumor, que da por resultado toxicidad inferior para tejidos no diana y así menor toxicidad sistémica. Con el fin de lograr este objetivo se han descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a células que específicamente se dirigen a células tumorales {patentes de US 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545}. Estos conjugados muestran típicamente elevada citotoxicidad específica de la diana *in vitro*, y actividad antitumoral excepcional en modelos de xenoinjertos de tumores humanos en ratones {R.V. J. Chari et al., *Cancer Res.*, **55**, 4079-4084 (1995)}.

Los agentes de unión a células típicamente solo son solubles en medio acuoso, y habitualmente se guardan en disoluciones acuosas. Así, estos análogos deben poseer suficiente solubilidad en agua para permitir la reacción eficaz con agentes de unión a células y subsiguiente formulación en disolución acuosa. Además, para que los conjugados de agentes de unión a células tengan una vida de conservación útil es

importante que los análogos de CC-1065 que están enlazados a estos agentes de unión a células sean estables en disoluciones acuosas durante un período de tiempo prolongado.

Los análogos de CC-1065 descritos hasta ahora (ver por ejemplo **Figs. 1B y 1C**) son solamente poco solubles en agua. A causa de la escasa solubilidad de los análogos CC-1065, las reacciones de conjugación con agentes de unión a células se han de realizar actualmente en disoluciones acuosas extremadamente diluidas. Por tanto, estos profármacos deben tener mayor solubilidad en agua en comparación con los fármacos parentales.

También, los análogos de CC-1065 que se han descrito hasta ahora son bastante inestables en disoluciones acuosas por la razón siguiente. La forma seco del fármaco se convierte espontáneamente en la forma ciclopropilo que después puede alquilar al DNA si está presente. Sin embargo, la reacción concurrente de la forma ciclopropilo con agua da por resultado la apertura del anillo ciclopropílico para producir el compuesto hidroxilado, que es inactivo. Así, existe una necesidad de proteger la parte reactiva de análogos de CC-1065 con el fin de prolongar su vida útil en disolución acuosa, por ejemplo por el desarrollo de profármacos de análogos de CC-1065.

Por tanto existe una necesidad de desarrollar profármacos de análogos de CC-1065 que sean muy estables tras conservación en disoluciones acuosas. Preferentemente estos profármacos se deben convertir solamente en fármacos activos *in vivo*. Una vez que el profármaco se infunde en el paciente, preferentemente se debe convertir de modo eficaz en el fármaco activo.

Carzelesina es un profármaco en donde el grupo fenólico de adozelesina está protegido como un carbamato de fenilo {L.H. Li et al., *Cancer Res.*, **52**, 4904-4913 (1992)}. Sin embargo, este profármaco es demasiado lábil para uso terapéutico, y también no proporciona incremento alguno en la solubilidad en agua en comparación con el fármaco parental. En un segundo ejemplo, el residuo fenólico de un análogo de CC-1065 se glicosiló para producir un profármaco (patente de US 5.646.298). Sin embargo, este profármaco no se convierte en fármaco activo *in vivo*, y requiere la administración adicional de una enzima de una fuente bacteriana para convertirlo en la forma citotóxica.

Hay algunos ejemplos de fármacos anticancerígenos, no relacionados con CC-1065, que se han convertido en profármacos solubles en agua. En el fármaco anticancerígeno irinotecan el grupo fenólico está protegido por un 4-piperidino-

5 piperidinocarbamato. Se ha descrito que este grupo protector confiere al fármaco solubilidad en agua. Además, el profármaco se convierte fácilmente en el fármaco activo *in vivo* en humanos, probablemente por la enzima carboxilesterasa que existe naturalmente en suero, tejido tumoral y en algunos órganos {A. Sparreboom, 4, *Clin. Cancer Res.*, 2747-2754 (1998). L.P. Rivory et al., 52, *Biochem Pharmacol.*, 1103-1111 (1996)}.

10 De igual manera el fármaco anticancerígeno fosfato de etopósido es un ejemplo de un profármaco que tiene un grupo protector fosfato y se convierte rápidamente en fármaco activo *in vivo*, probablemente mediante hidrólisis por fosfatasa alcalina endógena {S.Z. Fields et al., 1 *Clin. Cancer Res.*, 105-111 (1995)}.

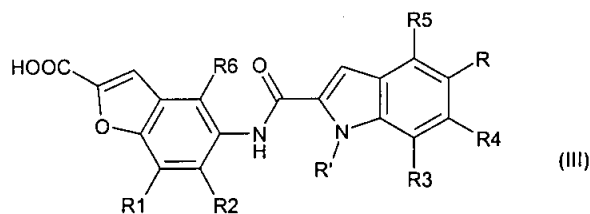
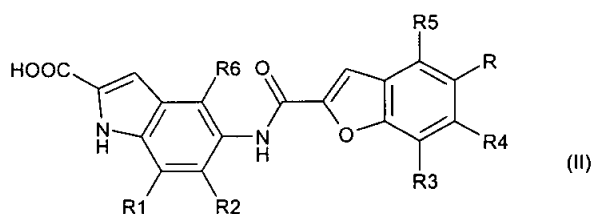
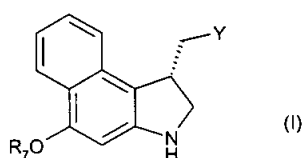
15 Recientemente R.Y. Zhao et al. (documento US 6,756,397 B2) describieron una primera clase de profármacos solubles en agua de análogos de CC-1065 que comprenden carbamatos o sustituyentes fosfato en el anillo fenólico de la parte alquilante de la molécula. Los presentes inventores han descubierto que la solubilidad de los compuestos que contienen estos tipos de sustituyentes puede ser insatisfactoria bajo condiciones fisiológicas. Además, estos compuestos pueden requerir la acción de agentes específicos tales como fosfatasas para su conversión en la forma biológicamente activa. Por tanto existe una necesidad general de análogos de CC-1065 que tengan mayor solubilidad en disolución acuosa y/o puedan ser fácilmente
20 solubles en condiciones fisiológicas. Adicionalmente es muy deseable facilitar su conjugación con agentes de unión a células en disoluciones acuosas mientras se preserva su actividad biológica. Además, con el fin de reducir efectos secundarios tóxicos sería conveniente proporcionar el análogo de CC-1065 en la forma de un profármaco que se convierte en el fármaco citotóxico predominantemente en el sitio
25 terapéutico deseado y preferentemente mediante hidrólisis espontánea a pH fisiológico. Todas estas ventajas y más se proporcionan por la invención descrita aquí, como será evidente a un experto en la técnica tras leer la descripción y ejemplos siguientes.

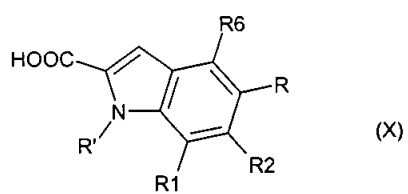
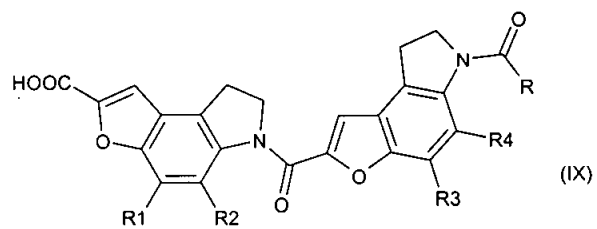
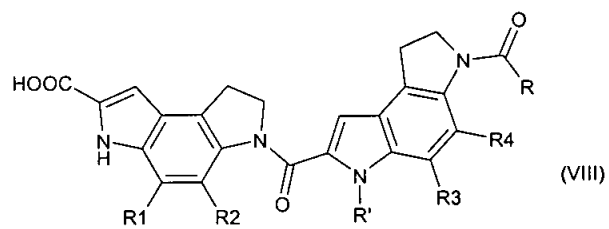
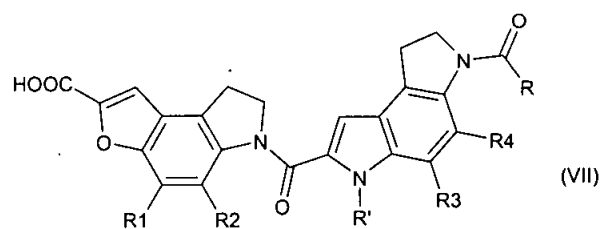
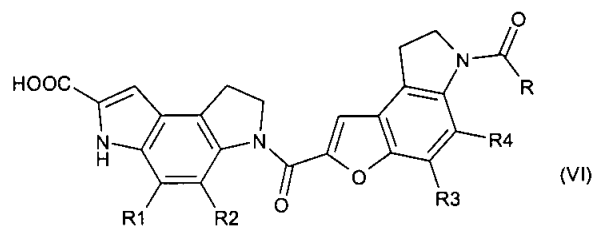
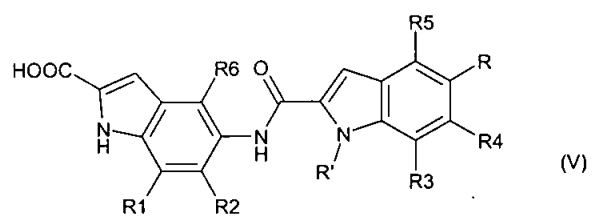
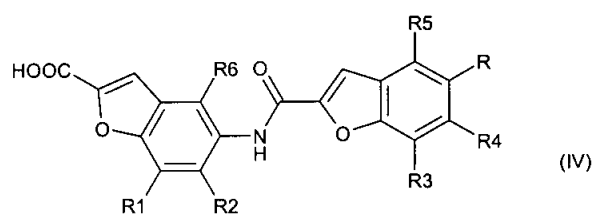
30 SUMARIO DE LA INVENCION

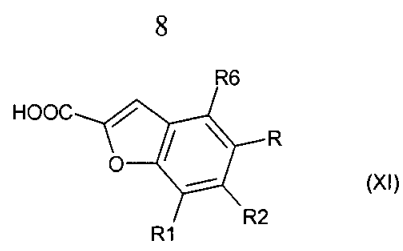
El objetivo de la presente invención es proporcionar profármacos de análogos de CC-1065 que tienen mayor solubilidad en medio acuoso. Este y otros objetivos se han logrado proporcionando profármacos en los que el grupo fenólico de la parte alquilante de la molécula está protegido con una funcionalidad que hace al fármaco
35 estable tras conservación en disolución acuosa ácida. Además, el grupo protector

confiere mayor solubilidad en agua al fármaco en comparación con un análogo no protegido. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* a pH fisiológico para dar el correspondiente fármaco activo. En los profármacos aquí descritos el sustituyente fenólico está protegido como un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo que posee una carga a pH fisiológico y así tiene mayor solubilidad en agua. Con el fin de aumentar más la solubilidad en agua se puede introducir un espaciador opcional de poli(etilenglicol) en el enlazador entre la subunidad de indolilo y el enlace escindible tal como un grupo disulfuro. La introducción de este espaciador no altera la potencia del fármaco.

Una realización más específica de la invención proporciona un profármaco que comprende un análogo de un fármaco citotóxico que contiene seco-ciclopropabencindol, que tiene un grupo protector, que aumenta la solubilidad y estabilidad en agua y que se puede escindir *in vivo* a pH fisiológico. El profármaco de esta realización específica tiene una primera y una segunda subunidad que están unidas por un enlace amida desde el grupo amino secundario del resto pirrólico de la primera subunidad al carboxilo C-2 de la segunda subunidad. La primera subunidad se muestra como fórmula (I), y es conjugada de la segunda subunidad, que se selecciona de entre las fórmulas (II)-(XI):







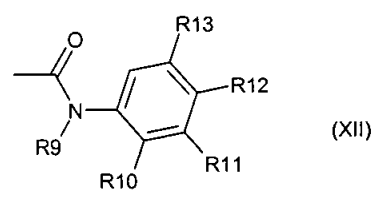
o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros,

5 en donde:

Y representa un grupo eliminable seleccionado de, pero no limitado a, un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro), metanosulfonato, para-toluenosulfonato, trifluorometanosulfonato, mononitro- o dinitrofenolato. Preferentemente el grupo eliminable es un cloruro o bromuro.

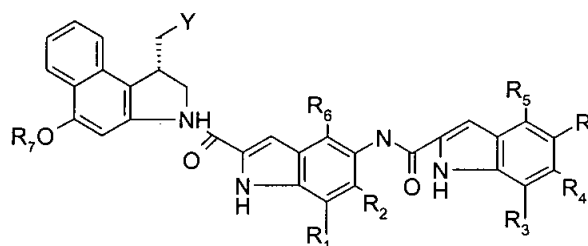
10 R, R', R₁-R₆ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo-C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido o un enlazador que proporciona enlace del profármaco a un agente de unión a células, en donde tal enlace es preferentemente a través de un enlace sulfuro o disulfuro, y con tal de que al menos uno de R, R', R₁-R₆ sea un enlazador. Preferentemente R es un
15 enlazador. El enlazador puede comprender un espaciador de poli(etilenglicol).

R₇ es el grupo protector que se puede escindir *in vivo* y aumenta la solubilidad en agua del fármaco citotóxico que contiene ciclopropabencindol, y es un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo. R₇ tiene la fórmula general XII:



20 en donde R₉ es H o un alquilo-C₁-C₄ ramificado o lineal. R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ son idénticos o diferentes con al menos uno que es un grupo -X-SO₃⁻M⁺, siendo M⁺ H⁺ o el catión que procede de un átomo del grupo IA, tal como Na⁺, K⁺, etc. and siendo X un enlace directo o un espaciador elegido de alquilo C1 a C4 lineal o ramificado, alquenilo o alquinilo, un -Oalquilo-, -Salquilo- y aminoalquilo y siendo los otros R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃
25 H, un alquilo-C₁-C₆ ramificado o lineal, -Oalquilo, -Salquilo, hidroxilo, amino primario, amino secundario, o amido, haluro, nitro, azido.

De acuerdo con una realización preferida, el profármaco de la invención es de la fórmula:



en donde Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R están definidos como anteriormente y en

5 donde R es un enlazador como se ha definido aquí,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

Preferentemente, dicho profármaco se elige del grupo consistente en:

10 (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxi-sulfonifenil)aminocarboniloxi]-3H-benz(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditiopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

(S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonifenil)-aminocarboniloxi]-3H-benz(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida

15 (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benz(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-(2-piridilditio)-propanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

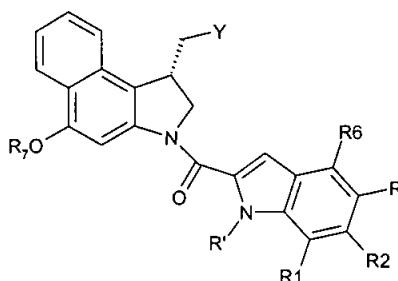
20 (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benz(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

(S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benz(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

25 o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

De acuerdo con otra realización preferida, el profármaco es de la fórmula:

10



en donde Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R están definidos como anteriormente, y en donde R es un enlazador como se ha definido anteriormente, o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las

5 estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

Preferentemente, dicho profármaco se elige del grupo consistente en:

Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico,

10 Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-(metildisulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

15 Los profármacos de la invención se pueden usar en conjugados citotóxicos en los que un agente de unión a células está enlazado a uno o más profármacos de la presente invención a través de un grupo enlazante.

Dicho grupo enlazante comprende dicho enlazador como se ha definido anteriormente ligado a una función reactiva respecto a tiol, sulfuro o disulfuro del

20 agente de unión a células.

Los agentes de unión a células incluyen anticuerpos y sus fragmentos, interferones, linfoquinas, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento. Se proporcionan también composiciones farmacéuticas que contienen tales conjugados.

Los conjugados citotóxicos se pueden usar en un método para tratar un sujeto

25 administrando una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior. De acuerdo con el tipo celular al que el agente de unión a células seleccionado se enlaza, muchas enfermedades se pueden tratar ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Tales enfermedades incluyen por ejemplo el tratamiento de muchas clases de cancer, que incluyen linfomas, leucemias, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón,

30 páncreas y similares.

Así, se han proporcionado profármacos de análogos de CC-1065 que han mejorado la solubilidad y estabilidad en disolución acuosa, y que retienen citotoxicidad cuando se activan para producir un fármaco alquilante, y que son útiles para dirigirlos a tipos de células diana específicos por medio de conjugación a un agente específico de unión a células.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1A** muestra la estructura de CC-1065 y sus subunidades A, B, y C.

La **Fig. 1B** y **Fig. 1C** muestran las estructuras de dos análogos conocidos de CC-1065.

La **Fig. 1D** muestra la preparación de producto intermedio DC1SMe (ver también la patente de US 6534660 B1)

La **Fig. 2** muestra las estructuras de análogos de CC-1065 y profármacos ejemplares de la presente invención.

La **Fig. 3** muestra las estructuras de profármacos ejemplares de la presente invención que contienen poli(etilenglicol).

La **Fig. 4 A, y C** son esquemas de síntesis para preparar (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilfenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditiopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC07SMe), (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxi-sulfonilfenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC07), (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetilfenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-(2-piridilditio)propanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC08SPy), y (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetilfenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC08), ácido (S)-3-((1-clorometil)-3-(5-(3-(metildisulfanil)-propanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico (DC101SMe), ácido (S)-3-((1-clorometil)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico (DC107).

La **Fig. 5** muestra el esquema que representa el procedimiento de activación/inactivación de los fármacos a pH fisiológico.

La **Fig. 6** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de DC07-SMe y DC1-SMe frente a células Ramos y HL60, exposición de 5 días.

La **Fig. 7** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de DC1-SPy y DC07-Spy frente a

células Ramos y HL60

La **Fig. 8** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de DC08-Spy frente a células RAMOS y Namalwa.

La **Fig 9** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de DC101-SMe y DC107-SMe
5 frente a células HL-60 y Ramos.

La **Fig 10** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de MY9-6-DC07 (enlazado por disulfuro) frente a células KARA y RAMOS.

La **Fig 11** muestra los datos de citotoxicidad *in vitro* de huC242-DC07 (enlazado por tiotéter) frente a células COLO205 y A-375.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han encontrado que la estabilidad, solubilidad en agua y utilidad de ciertos análogos de CC-1065 han aumentado por protección del resto alquilante del análogo con un grupo protector adecuado. Los inventores han
15 proporcionado con ello profármacos de análogos de CC-1065 que tienen mayor solubilidad en agua y que además son capaces de enlazarse a agentes de unión a células, con lo que la eficacia terapéutica de tales profármacos de análogos de CC-1065 se mejora cambiando la distribución *in vivo* mediante liberación dirigida del profármaco al sitio del tumor, dando por resultado una inferior toxicidad para tejidos no
20 diana y por tanto toxicidad sistémica inferior. El pH fisiológico convierte sustancialmente el profármaco en su forma de fármaco activa, y en realizaciones que tienen un escindible enlazador al agente de unión a células se libera la forma de fármaco activa del análogo de CC-1065, así aumentando más su actividad citotóxica. Alternativamente, el enlazador al agente de unión a células puede escindir-se
25 primeramente en el interior de la célula diana para liberar el profármaco, seguido por conversión endógena en el fármaco activo.

Con el fin de alcanzar este objetivo, los inventores sintetizaron profármacos ejemplares (**Fig. 2-4B**) de análogos de CC-1065 que son profármacos citotóxicos, que contienen seco-ciclopropabencindol (CBI), que comprenden: (a) una primera
30 subunidad de fórmula (I) que está protegida en el hidroxilo fenólico por un grupo protector para aumentar la solubilidad en agua y que se escinde *in vivo* a pH fisiológico, y (b) una segunda subunidad que tiene la estructura representada por una de las fórmulas (II)-(XI) y que comprende un enlazador para conjugación del profármaco a un agente de unión a células. El enlazador puede contener un
35 espaciador de poli(etilenglicol) (**Fig. 3**). La separación del grupo protector del

profármaco produce una forma activa del fármaco que conserva la elevada citotoxicidad del fármaco parental. El enlazador se usa para conjugación a agentes de unión a células, preferentemente comprende un enlace disulfuro o un enlace sulfuro (o llamado aquí tioéter).

- 5 Se ha demostrado previamente que el enlace de fármacos muy citotóxicos a anticuerpos usando un enlace escindible, tal como un enlace disulfuro, asegura la liberación de fármaco completamente activo en el interior de la célula, y que tales conjugados son citotóxicos de un modo específico de antígenos {R. V. J. Chari et al, 52 Cancer Res. 127-131 (1992); R.V.J. Chari et al., 55 Cancer Res. 4079-4084 (1995);
- 10 y las patentes de U.S. Nos. 5.208.020 y 5.475.092}. En la presente invención los inventores describen la síntesis de profármacos de análogos de CC-1065, procedimientos para su conjugación a anticuerpos monoclonales y para medida de la citotoxicidad y especificidad *in vitro* de tales conjugados. Así, la invención proporciona compuestos útiles para la preparación de agentes terapéuticos dirigidos a la
- 15 eliminación de células enfermas o anormales que se han de destruir o lisar tales como células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunes (células que producen auto-anticuerpos), células activadas (las implicadas en el rechazo de injerto o injerto frente a la enfermedad del huésped), o cualquier otro tipo de células enfermas
- 20 o anormales mientras que exhiben efectos secundarios mínimos.

Así, esta invención enseña la síntesis de análogos y derivados profármacos de CC-1065 que se pueden enlazar químicamente a un agente de unión a células y que mantienen, tras la liberación del grupo protector, la elevada citotoxicidad del compuesto parental CC-1065. Además, por activación, estos compuestos cuando se

25 enlazan a un agente de unión a células son citotóxicos frente a células a las que el agente de unión a células se une y son mucho menos tóxicos frente a células no diana.

Profármacos de la presente invención

- Los profármacos de acuerdo con la presente invención comprenden un
- 30 análogo de CC-1065 en que el grupo fenólico de la parte alquilante de la molécula está protegido y el profármaco comprende además un enlazador capaz de conjugarse el profármaco a un agente de unión a células. El profármaco puede comprender una primera y una segunda subunidad que están unidas a través de un enlace amida.

- De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el profármaco
- 35 del análogo de CC-1065 tiene una primera subunidad que es un seco-CBI (unidad de

ciclopropabencindol) en su forma halometílica abierta, en donde la primera subunidad tiene un hidroxilo fenólico que está protegido por un grupo protector soluble en agua que se puede escindir *in vivo*. La segunda subunidad del profármaco de ciertas realizaciones de la presente invención comprende un análogo de la subunidad B o de las subunidades B y C combinadas de CC-1065 (**Fig. 1**) que son 2-carboxi-indol- or 2-carboxi-benzofurano-derivados, o ambos, y están representados por las fórmulas (II)-(XI). Como se puede determinar a partir del CC-1065 natural y de las propiedades de los análogos que se han publicado {por ejemplo Warpehoski et al, 31 J. Med. Chem. 590-603 (1988), Boger et al, 66 J. Org. Chem. 6654-6661 (2001)}, las subunidades B y C pueden comprender también otros heterociclos o heterociclos sustituidos y así pueden llevar sustituyentes diferentes en posiciones diferentes en los anillos de indol o benzofurano que corresponden a posiciones R₁-R₆ de las fórmulas (II)-(XI), y aun conservan actividad citotóxica potente.

Con el fin de enlazar el profármaco del análogo de CC-1065 a un agente de unión a células, el profármaco debe incluir primeramente un resto que permita a los derivados enlazarse a un agente de unión a células a través de un enlace tal como un enlace disulfuro, un enlace sulfuro (o llamado aquí tioéter), un grupo lábil a los ácidos, un grupo fotolábil, un grupo lábil a las peptidasas, o un grupo lábil a las esterasas. Los análogos profármacos se preparan de manera que contienen un resto necesario para enlazar el análogo a un agente de unión a células a través de, por ejemplo, un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un grupo lábil a los ácidos, un grupo fotolábil, un grupo lábil a las peptidasas, o un grupo lábil a las esterasas. Con el fin de aumentar más la solubilidad en disoluciones acuosas, el enlazador puede contener un espaciador de poli(etilenglicol) (**Fig. 3**).

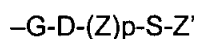
Preferentemente se usa un enlace disulfuro porque el medio reductor de la célula diana da por resultado la escisión del disulfuro y liberación del profármaco (o fármaco, dependiendo de la secuencia relativa de escisión del profármaco del agente de unión a células e hidrólisis del grupo protector), con un aumento de citotoxicidad asociado.

Más específicamente, de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención el profármaco de un análogo de CC-1065 comprende las subunidades primera y segunda que están unidas covalentemente a través de un enlace amida del grupo amino secundario desde el resto pirrólico de la primera subunidad al grupo carboxi C-2 de la segunda subunidad que tiene las fórmulas (II)-(XI).

Dentro de las fórmulas (II)-(XI), el enlazador permite el enlace del profármaco

de un análogo de CC-1065 a un agente de unión a células. El enlazador puede contener un espaciador de poli(etilenglicol). Los ejemplos incluyen restos que permiten uniones por la vía de enlace disulfuro, un enlace tioéter, un grupo lábil a ácidos, un grupo fotolábil, un grupo lábil a peptidasas, o un grupo lábil a esterasas, y son muy conocidos en la técnica (ver por ejemplo la patente de U.S. 5.846.545, que se incorpora aquí por referencia). Restos preferidos son los que permiten unión a través de enlace disulfuro, por ejemplo un tiol (DC1, DC07, DC08) o un disulfuro (DC1-SMe, DC07-SMe, DC08SPy, ver **Fig. 2-4B**). Se pueden usar disulfuros mixtos que contienen cualquier grupo eliminable terminal tales como tiometilo (DC1-SMe, DC07-SMe), DC08SPy, glutatión, alquiltiol, piridiltio, ariltiol, nitropiridiltio, hidroxycarbonilpiridiltio, (nitro)hidroxycarbonil-piridiltio, y similares, con tal de que tales disulfuros sean capaces de sufrir una reacción de intercambio de disulfuro para la conexión del profármaco a un agente de unión a células. El enlazador opcionalmente puede comprender además una región espaciadora interpuesta entre el grupo reactivo de la parte que permite enlace y la parte del 2-carboxi-indol- o 2-carboxi-benzofurano-derivado.

Preferiblemente, dicho enlazador es de fórmula:



en la que

G es un enlace sencillo o doble, -O-, -S- or -NT-;

D es un enlace sencillo o -E-, -E-NT-, -E-NT-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NT-CO-, -E-NT-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NT-C-S-, -E-NT-CS-F- ;

En donde T es H o un alquilo-C₁-C₆ ramificado o lineal;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre - (OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j- lineal o ramificado, -Alquil(OCH₂CH₂)_i-Alquil-,

- (OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-,

-(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-,

-(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAlquil(OCH₂CH₂)_j-,

-Alquil-(OCH₂CH₂)_i-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iCicloalquil(OCH₂CH₂)_j-,

-Alquil(OCH₂CH₂)_iHeterocíclico(OCH₂CH₂)_j-, -Alquil-(OCH₂CH₂)_iAril(OCH₂CH₂)_j-,

-Alquil(OCH₂CH₂)_iHeteroaril(OCH₂CH₂)_j-, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-,

-Heterocíclico-Alquil-, -Alquil-Heterocíclico-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-,

-Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

donde i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

p es 0 ó 1;

Z' representa H, un grupo protector de tioles tal como COR, R₂₀ or SR₂₀, en donde R₂₀ representa H, metilo, alquilo, y cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclo opcionalmente sustituidos.

5 Se prefieren las siguientes realizaciones o cualquiera de sus combinaciones:

- G es un enlace sencillo o -NT-;
- G es -NT-;
- D es -CO-E-;
- E es un -alquilo- lineal o ramificado;

10 - p es 0;

- Z' es H o SR₂₀, en donde R₂₀ representa alquilo o heteroarilo;

Las realizaciones preferidas del enlazador incluyen (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCO (CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO (CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCHMeSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCMe₂SZ or (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, en donde: Z representa H, un grupo protector de tioles tal como a Ac, R₈ or SR₈, en donde R₈ representa metilo, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo o heterociclo simple o sustituido, y m representa un número entero de 0 a 10, n representa un número entero de 0 a 2000, p representa un número entero de 0 a 10.

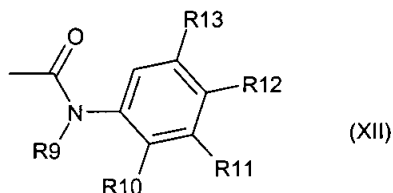
Los ejemplos de alquilos lineales representados por R₈ incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Los ejemplos de alquilos ramificados representados por R₈ incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etilpropilo. Los ejemplos de alquilos cíclicos representados por R₈ incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los ejemplos de arilos simples representados por R₈ incluyen fenilo y naftilo. Los ejemplos de arilos sustituidos representados por R₈ incluyen arilos tales como fenilo o naftilo sustituidos con grupos alquilo, con halógenos tales como Cl, Br, F, grupos nitro, grupos amino, grupos de ácidos sulfónicos, grupos de ácidos carboxílicos, grupos hidroxilo y grupos alcoxi. Los heterociclos representados por R₈

son compuestos en donde los heteroátomos se seleccionan de O, N, y S, y los ejemplos incluyen furilo, pirrolilo, piridilo, (por ejemplo un grupo de pirimidina 2-sustituida) y tiofeno.

Las realizaciones más preferidas del enlazador incluyen $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2SH$,
 5 $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2C(Me)_2SH$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2SSCH_3$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2$
 $(OCH_2CH_2)_nSH$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nC(Me)_2SSCH_3$ y $(CH_2)_pNHCO$
 $(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nSSMe$.

Dentro de las fórmulas (II)-(XI), R, R', R₁ a R₆, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente hidrógeno, alquilo lineal-C₁-C₃, metoxi,
 10 hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido o un enlazador, con tal de que al menos uno de R, R', R₁ a R₆ sea un enlazador. Preferentemente R es un enlazador. Ejemplos de sustituyentes que contienen grupo amino primario son metilamino, etilamino, e isopropilamino. Ejemplos de sustituyentes que contienen grupo amino secundario son dimetilamino, dietilamino, y etilpropilamino. Los ejemplos
 15 de grupos amido incluyen N-metilacetamido, N-metilpropionamido, N-acetamido, y N-propionamido.

Dentro de las fórmulas (II)-(XI), R₇ es un grupo protector escindible *in vivo* que aumenta la solubilidad en agua del fármaco citotóxico que contiene seco-ciclopropabencindol, en donde dicho grupo se puede elegir de uno sulfónico que
 20 contiene carbamato de fenilo de fórmula general XII:



en donde R₉ es H o un alquilo-C₁-C₄ ramificado o lineal. R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ son idénticos o diferentes con al menos uno que es un grupo $-X-SO_3^-M^+$, siendo M⁺ H⁺ o el catión que procede de un átomo del grupo IA, tal como Na⁺, K⁺, etc. y siendo X un enlace
 25 directo o un espaciador elegido de alquilo C1 a C4 lineal o ramificado, alquenilo o alquinilo, un -Oalquilo-, -Salquilo- y aminoalquilo y siendo los otros R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃ H, un alquilo-C₁-C₆ ramificado o lineal, -Oalquilo, -Salquilo, hidroxilo, amino primario, amino secundario, o amido, haluro, nitro, azido.

Los ejemplos de alquilos lineales representados por R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃
 30 incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Los ejemplos de alquilos ramificados representados por R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃ incluyen isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, isopentilo y 1-etilpropilo. Los ejemplos de alquilos cíclicos

representados por R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃ incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Así, los grupos sulfónicos que contienen carbamatos de fenilo resultan ser escindibles por hidrólisis a pH fisiológico que ocurre en suero y plasma.

- 5 Los profármacos de análogos de CC-1065 que contienen sulfuro o disulfuro y que contienen mercapto de la presente invención se pueden evaluar por su capacidad de suprimir la proliferación de diversas líneas celulares indeseadas *in vitro* bajo condiciones de incubación. Se pueden usar fácilmente líneas celulares tales como, por ejemplo, la línea celular Ramos y HL60 para la evaluación de la citotoxicidad de estos
- 10 compuestos. Las células a ser evaluadas se pueden exponer a los compuestos durante 24 horas y las fracciones de células supervivientes se pueden medir en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de IC₅₀ se pueden calcular después a partir de los resultados de los ensayos.

- Como se usa aquí, la expresión "enlazable a un agente de unión a células" se refiere
- 15 a los profármacos de análogos de CC-1065 que comprenden al menos un enlazador, o un precursor suyo, adecuado para enlazar dichos derivados a un agente de unión a células; los enlazadores preferidos contienen enlaces tiol, sulfuro o disulfuro, o sus precursores.

- Como se usa aquí, la expresión "enlazado a un agente de unión a células" se refiere a la molécula de conjugado que comprende al menos un profármaco análogo de CC-1065
- 20 enlazado a un agente de unión a células a través de un enlazador adecuado, o un precursor suyo; los enlazadores preferidos contienen enlaces tiol, sulfuro o disulfuro, o sus precursores.

- La expresión "agente de unión a células" incluida aquí incluye también agentes de unión a células modificados, en donde dicho agente de unión a células se modifica
- 25 por un agente modificador para mejorar la reactividad de dicho agente de unión a células frente a las funciones reactivas, por ejemplo enlaces mercapto, sulfuro o disulfuro del enlazador del profármaco análogo de CC-1065. Dichos agentes de modificación incluyen N-sulfosuccinimidil-4-(5-nitro-2-piridilditio)butanoato (SSNPB), 4-[N-maleimidometil]-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), N-
- 30 hidroxisuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico acid (SPDB) y similares como se describe más adelante.

- Como se usa aquí, el término "análogo" se refiere a un compuesto que comprende una forma modificada químicamente de un compuesto o clase específicos suyos, y que mantiene las actividades farmacéuticas y/o farmacológicas
- 35 características de dicho compuesto o clase.

Como se usa en este documento, el término "paciente" se refiere a un animal, tal como un animal valioso para cría, compañía o conservación, o preferiblemente un ser humano o un niño que padece o que puede padecer una o más enfermedades y afecciones descritas en este documento.

- 5 Como se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz para prevenir, reducir, eliminar, tratar o controlar los síntomas de las enfermedades y afecciones descritas en este documento. El término "controlar" pretende referirse a todos los procesos en los que existe un retraso, interrupción, detención o parada de la progresión
10 de las enfermedades y afecciones descritas en este documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad o afección, y pretende incluir tratamiento profiláctico.

- Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas de dosificación
15 que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para ponerse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas u otras complicaciones problemáticas en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable.

- Como se usa en este documento, la expresión "sales farmacéuticamente
20 aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto parental se modifica preparando sales de ácidos o bases del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o la sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales
25 incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio
30 tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, cinc o magnesio.

- Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse haciendo
35 reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad

estequiométrica de la base apropiada o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, página 1418, cuya descripción se incorpora en este documento como referencia.

De acuerdo con un objetivo también adicional, la presente invención se refiere también al procedimiento de preparación de los compuestos de la invención.

Los compuestos y procesos de la presente invención pueden prepararse por varias rutas bien conocidas por los especialistas en la técnica. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, por aplicación o adaptación de los métodos que se describen a continuación, o variaciones de los mismos que puedan apreciarse por los especialistas en la técnica. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán muy obvias y se conocerán bien o podrán obtenerse fácilmente a partir de la bibliografía científica por los especialistas en la técnica.

En particular, tales métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Se apreciará que los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y pueden aislarse en formas ópticamente activa o racémica. Por lo tanto, se desean todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la estereoquímica específica o la forma isomérica. Se sabe bien en la técnica cómo preparar y aislar tales formas ópticamente activas. Por ejemplo, pueden separarse mezclas de estereoisómeros por técnicas convencionales que incluyen, pero sin limitación, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, de fase inversa y quiral, formación de sales preferencial, recristalización, y similares, o por síntesis quiral a partir de materiales de partida quirales o por síntesis deliberada de centros quirales diana.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de rutas sintéticas. Los reactivos y materiales de partida están disponibles en el mercado, o se sintetizan fácilmente por técnicas bien conocidas por un especialista en la técnica. Todos los sustituyentes, a menos que se indique otra cosa, son como se han definido anteriormente.

En las reacciones descritas en adelante, puede ser necesario proteger los grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, cuando se

desean en el producto final, para evitar su participación indeseada en las reacciones. Pueden usarse grupos protectores convencionales de acuerdo con la práctica convencional, para ejemplos, véase T.W. Greene y P. G. M. Wuts en *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3ª ed., John Wiley y Sons, 1999; J. F. W. McOmie en *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

- 5 Algunas reacciones pueden realizarse en presencia de una base. No existe ninguna restricción particular sobre la naturaleza de la base a usar en esta reacción, y puede usarse aquí igualmente cualquier base usada convencionalmente en reacciones de este tipo, con la condición de que no afecte de forma adversa a las otras partes de la molécula.
- 10 Los ejemplos de bases adecuadas incluyen: hidróxido sódico, carbonato potásico, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, tales como hidruro sódico e hidruro potásico; compuestos de alquil-litio, tales como metil-litio y butil-litio; y alcóxidos de metales alcalinotérreos, tales como metóxido sódico y etóxido sódico.

- 15 Normalmente, las reacciones se realizan en un disolvente adecuado. Puede usarse una diversidad de disolventes, con la condición de que no afecte de forma adversa a la reacción o a los reactivos implicados. Los ejemplos de disolventes adecuados incluyen: hidrocarburos, que pueden ser hidrocarburos aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, tales como hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y xileno; amidas, tales como dimetilformamida; alcoholes tales como etanol y metanol y éteres, tales como éter dietílico
- 20 y tetrahidrofurano.

- Las reacciones pueden realizarse en un amplio intervalo de temperaturas. En general, se encuentra conveniente realizar la reacción a una temperatura de 0°C a 150°C (más preferiblemente de aproximadamente la temperatura ambiente a 100°C). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos
- 25 factores, en particular de la temperatura de reacción y de la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, si la reacción se realiza en las condiciones preferidas indicadas anteriormente, normalmente será suficiente un periodo de 3 horas a 20 horas.

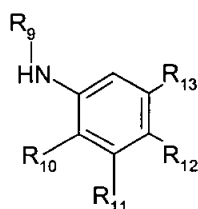
- El compuesto preparado de esta manera puede recuperarse de la mezcla de reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse
- 30 mediante retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario después de la retirada por destilación del disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de la extracción con un disolvente orgánico immiscible en agua y retirando por destilación el disolvente del extracto. Adicionalmente, el producto puede, si se desea, purificarse más por diversas técnicas conocidas, tales como recristalización,
- 35 reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, principalmente cromatografía en

columna o cromatografía de capa fina preparativa.

El procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula de la invención es un objetivo adicional de la presente invención.

El procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula comprende la
 5 etapa de proteger el grupo fenólico de la parte alquilante del correspondiente análogo de CC-1065 por un ácido sulfónico que contiene la función carbamato. Esta reacción se puede realizar por aplicación o adaptación de los métodos para proteger grupos OH con una función carbamato descritos en T.W. Greene y P. G. M. Wuts en *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999 o J. F. W. McOmie en
 10 *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Generalmente, esta reacción se realiza con CDI/DMA y el correspondiente aminofenilsulfonato-derivado de fórmula:



en donde R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ están definidos como en la fórmula (XII).

15 El procedimiento puede incluir la etapa adicional de aislar el producto obtenido.

Preparación de agentes de unión a células

Los compuestos profármacos de la invención se pueden usar como conjugados con un agente de unión a células como agentes terapéuticos eficaces. Los agentes de
 20 unión a células pueden ser de cualquier clase actualmente conocidos, o que llegan a conocerse, e incluyen péptidos y no péptidos. En general, pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales) o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra
 25 molécula o sustancia de unión a las células.

Los ejemplos más específicos de agentes de unión a las células que pueden usarse incluyen:

- anticuerpos monoclonales;
- anticuerpos de cadena sencilla;
- 30 - fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y F_v {Parham, 131 J.

Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al, 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960));

- interferones;
- péptidos;
- 5 - linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotropina), MSH (hormona estimulante de melanocitos), hormonas esteroideas tales como andrógenos y estrógenos;
- factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias tales como EGF, TGF α ,
- 10 factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)); vitaminas tales como folato y
- transferrina {O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)}.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales permite la producción de agentes de unión extremadamente selectivos en forma de anticuerpos monoclonales
15 específicos. Son particularmente bien conocidos en la técnica las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por inmunización de ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados a partir de la célula diana, virus enteros, virus enteros atenuados y proteínas virales tales como proteínas de la cubierta viral.

20 La selección del agente de unión a las células apropiado se elige dependiendo de la población celular particular que se vaya a fijar como diana, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales si está disponible uno apropiado.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res., 521
25 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielógena aguda (AML). Análogamente, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG₁ murina que se une al antígeno CD19 en células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tales como en linfoma no-Hodgkin o leucemia
30 linfoblástica crónica.

Además, GM-CSF que se une a las células mielodes puede usarse como agente de unión a las células enfermas de la leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención del rechazo de injertos trasplantados, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra
35 hospedador y para el tratamiento de la leucemia aguda de células T. MSH, que se une

a los melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

Preparación de Conjugados de Profármacos

Se pueden formar conjugados de los profármacos y un agente de unión a células usando técnicas cualesquiera. Se puede preparar un indolil, benzofuranil, bis-indolil, bis-benzofuranil, indolil-benzofuranil, o benzofuranil-indolil derivado conectado al análogo seco-CBI para contener un grupo amino libre y después enlazarlo a un anticuerpo u otro agente de unión a células a través de un enlazador lábil a ácidos, o por un enlazador fotolábil. Los compuestos profármacos pueden condensarse con un péptido que tenga una secuencia adecuada y posteriormente enlazarse a un agente de unión a células para producir un enlazador lábil a peptidasas. Los compuestos citotóxicos pueden prepararse de manera que contengan un grupo hidroxilo primario, que puede succinilarse y unirse a un agente de unión a células para producir un conjugado que pueda escindirse por esterasas intracelulares para liberar el profármaco libre. Preferentemente los compuestos profármacos se sintetizan de manera que contengan un grupo tiol libre o protegido, con o sin un espaciador que contiene PEG, y después uno o más profármacos que contienen sulfuro, disulfuro o tiol se enlazan covalentemente al agente de unión a células a través de un enlace disulfuro o un enlace tioéter.

Conjugados representativos de la invención son conjugados de profármacos de análogos de CC-1065 con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona estimulante de melanocitos (MSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), estrógenos, análogos de estrógenos, andrógenos, y análogos de andrógenos.

A continuación se describen ejemplos representativos de la preparación de diversos conjugados de profármacos de análogos de CC-1065 y agentes de unión a células.

Enlazadores disulfuro: El anticuerpo huMy-9-6 es una forma genéticamente humanizada del anticuerpo monoclonal murino My-9-6 dirigido frente al antígeno CD33 encontrado en la superficie de células mieloides humanas que incluyen la mayoría de casos de leucemia mieloide aguda (AML) (E.J. Favalaro, K.F. Bradstock, A. Kabral, P. Grimsley & M.C. Berndt, *Disease Markers*, 5(4):215 (1987); M.G. Hoffee, D. Tavares, R.J. Lutz, Robert J., PCT Int. Appl. (2004) WO 2004043344). Se puede usar My-9-6 para la preparación de conjugados. El anticuerpo se modifica con 3-

piridilditiopropionato de N-succinimidilo como se ha descrito previamente {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, *Biochem. J.*, 173:723 (1978)} para introducir, en promedio, 4 grupos piridilditio por molécula de anticuerpo. El anticuerpo modificado se hace reaccionar con el profármaco que contiene tiol para producir un conjugado unido por enlaces disulfuro.

Enlazadores Tioéter: Los derivados que contienen tiol de la presente invención pueden unirse a anticuerpos y otros agentes de unión a las células a través de un enlace tioéter como se ha descrito previamente (Patente de Estados Unidos N° 5.208.020). El anticuerpo u otro agente de unión a células puede modificarse con el compuesto disponible comercialmente tal como N-succinimidil-4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-male-imidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazadores no escindibles derivados de restos basados en maleimido.

Los reactivos de entrecruzamiento que comprenden un resto basado en haloacetilo incluyen N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP). Estos reactivos de entrecruzamiento forman enlazadores no escindibles derivados de restos basados en haloacetilo. El agente de unión a células modificado se puede hacer reaccionar con un fármaco que contiene tiol para proporcionar un conjugado enlazado con tioéter.

Enlazadores Lábiles a Ácidos: Pueden enlazarse profármacos de la presente invención que contienen grupos amino a anticuerpos y otros agentes de unión a células a través de un enlazador lábil a ácidos como se ha descrito previamente. {W. A. Blattler et al, *Biochemistry* 24, 1517-1524 (1985); patente de U.S. Nos. 4,542,225, 4,569,789, 4,618,492, 4,764,368}.

Similarmente, un profármaco que contiene grupo hidrazido de la presente invención puede enlazarse a la parte de carbohidrato de anticuerpos y otros agentes de unión a células a través de un enlazador de hidrazona lábil a ácidos {para ejemplos de enlazadores de hidrazona ver B. C. Laguzza et al, *J. Med. Chem.*, 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al, *Cancer Res.*, 50, 6600-6607 (1990)}.

Enlazadores Fotolábiles: Los profármacos que contienen grupos amino de la

presente invención pueden enlazarse a anticuerpos y otros agentes de unión a células a través de un enlazador fotolábil como se ha descrito previamente {P. Senter et al, *Photochemistry and Photobiology*, 42, 231-237 (1985); Patente de Estados Unidos N° 4.625.014}.

5

Enlazadores Lábiles a Peptidasas: Los profármacos que contienen grupos amino de la presente invención también pueden enlazarse a agentes de unión a células a través de espaciadores peptídicos. Se ha demostrado previamente que los espaciadores peptídicos cortos entre fármacos y soportes macromoleculares proteicos son estables en suero, pero se hidrolizan rápidamente por peptidasas intracelulares {A. Trouet et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 626-629 (1982)}. Los profármacos que contienen grupos amino pueden condensarse con péptidos usando agentes de condensación tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC-HCl) para dar un derivado peptídico que puede enlazarse a agentes de unión a células.

15

Enlazadores Lábiles a Esterasas: Los profármacos de la presente invención que llevan un grupo hidroxialquilo pueden succinilarse con anhídrido succínico y después enlazarse a un agente de unión a células para producir un conjugado que puede escindirse por esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. {Como ejemplos véase E. Aboud-Pirak et al, *Biochem Pharmacol.*, 38, 641-648 (1989)}.

20

Los conjugados de análogos de CC-1065 con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas proteicas o peptídicas, factores de crecimiento proteicos o peptídicos y otras proteínas se elaboran de la misma forma por métodos conocidos. Por ejemplo, los péptidos y anticuerpos pueden modificarse con reactivos de entrecruzamiento tales como 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo, 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-succinimidyl-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridil ditio)-tolueno (SMPT), *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SDPB), piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP), *N*-hidrosuccinimidil éster del ácido 4-(2-piridilditio)butanoico (SPDB), 4-[*N*-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), *N*-sulfosuccinimidil-3-(2-(5-nitro-piridilditio)butirato (SSNPB), 2-iminotiolano o anhídrido *S*-acetilsuccínico por métodos conocidos. Véanse, Carlsson et al., 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978); Blattler et al., 24 *Biochem.* 1517-1524 (1985); Lambert et al., 22 *Biochem.* 3913-3920 (1983); Klotz et al., 96 *Arch. Biochem. Biophys.* 605 (1962); y Liu et al, 18 *Biochem.* 690 (1979), Blakey y Thorpe, 1 *Antibody, Immunoconjugates & Radio-pharmaceuticals*, 1-16 (1988), Worrell

35

et al 1 *Anti-Cancer Drug Design* 179-184 (1986). El agente de unión a células que contiene tiol libre o protegido obtenido de esta forma se hace reaccionar posteriormente con un análogo profármaco CC61065 que contiene disulfuro o tiol para producir los conjugados. Los conjugados pueden purificarse por cromatografía en columna estándar,
5 HPLC o filtración por gel.

Preferentemente, conjugados de análogos profármacos de CC-1065 con agentes de unión a células o con anticuerpos monoclonales son los que están unidos a través de un enlace disulfuro, como se ha discutido anteriormente, que son capaces de liberar análogos profármacos de CC-1065.

10 Tales conjugados de unión a células se preparan por métodos conocidos, tales como por modificación de los anticuerpos monoclonales con piridil-ditiopropionato de succinimidilo (SPDP) (Carlsson et al, 173 *Biochem. J.* 723-737 (1978)). El grupo tiopiridilo resultante se desplaza luego por tratamiento con análogos profármacos de CC-1065 que contienen tiol para producir conjugados enlazados por disulfuro. La conjugación por este
15 método se describe con detalle en la Patente de Estados Unidos 5.585.499, que se incorpora como referencia.

Alternativamente, en el caso de los análogos profármacos de arilditio-CC-1065 la formación del conjugado de unión a células se realiza por desplazamiento directo del aril-tiol del análogo profármaco de CC-1065 por grupos sulfhidrilo previamente introducidos
20 en las moléculas de anticuerpo. Conjugados que contienen de 1 a 10 análogos profármacos de CC-1065 enlazados a través de un puente disulfuro se preparan fácilmente por cualquier método.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, junto con
25 un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a un método para destruir o inhibir el crecimiento de células, preferiblemente poblaciones celulares seleccionadas, que comprende poner en contacto células diana o tejidos que
30 contienen células diana con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La población celular seleccionada consiste en células cancerosas y/o proliferativas.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención también se refiere a un
35 método de tratamiento, preferiblemente para el tratamiento selectivo de cánceres, que

comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

De acuerdo con la presente invención, "tratamiento selectivo de cánceres" se refiere a la destrucción de células cancerosas y/o proliferativas sin destruir
5 sustancialmente células normales y/o no proliferativas.

De acuerdo con otro objeto, la presente invención también se refiere al uso de una molécula conjugada de la invención o un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres.

10 El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto variantes deseadas que no expresen el antígeno diana; o para destruir variantes que expresan un antígeno indeseado.

15 Las condiciones de uso no clínico *in vitro* se determinan fácilmente por un especialista en la técnica.

Los ejemplos de usos *ex vivo* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; y tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T
20 competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

El tratamiento clínico *ex vivo* para retirar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento de cánceres o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para retirar células T y otras células linfoides de médula ósea alogénica o de tejidos antes del trasplante para prevenir la
25 GVHD, puede realizarse como se indica a continuación. Se recoge médula ósea del paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, en concentraciones que varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de
30 concentración y tiempo de incubación (=dosis) se determinan fácilmente por el especialista en la técnica. Después de la incubación, las células de médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo
35 entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas,

las células de médula ósea se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se suministrará como soluciones que se ensayan con respecto a la esterilidad y con respecto a los niveles de endotoxinas o como un sólido liofilizado que puede redisolverse en agua estéril para inyección. A continuación se proporcionan ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados. Los conjugados se administran semanalmente durante 6 semanas como una embolada i.v. Las dosis en embolada se administran en 50 a 400 ml de solución salina normal a la que puede añadirse albúmina de suero humano (por ejemplo, de 0,5 a 1 ml de una solución concentrada de albúmina de suero humano, 100 mg/ml). Las dosificaciones serán de aproximadamente 50 μ g a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (intervalo de 10 μ g a 100 mg/kg por inyección). Seis semanas después de tratamiento, el paciente puede recibir un segundo curso de tratamiento. El especialista en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo permita la situación.

Los ejemplos de situaciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de destrucción de poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; melanomas; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones virales tales como infección por CMV, infección por VIH, SIDA etc.; infección bacteriana; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras determinadas por un especialista en la técnica.

La identificación de los pacientes que necesitan tratamiento de las enfermedades y afecciones descritas en este documento está bien dentro de la capacidad y conocimiento del especialista en la técnica. Un veterinario o un médico especialistas en la técnica pueden identificar fácilmente, por medio del uso de ensayos clínicos, examen físico, historia médica/familiar o ensayos biológicos y diagnósticos, los sujetos que necesitan dicho tratamiento.

A cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por el médico a cargo del caso, como especialista en la técnica, por medio del uso de técnicas

convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, el médico a cargo del diagnóstico considera varios factores que incluyen, pero sin limitación: la especie del sujeto; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica implicada; el grado de
5 compromiso o gravedad de la enfermedad; la respuesta del sujeto individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I) o conjugado que se requiere para
10 conseguir el efecto biológico deseado variará dependiendo de varios factores que incluyen las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) de los compuestos empleados, la potencia de los compuestos, el tipo de enfermedad, la especie a la que pertenece el paciente, el estado de enfermedad del paciente, la vía de administración, la biodisponibilidad del compuesto por la vía elegida, todos los factores que dictan las
15 cantidades de dosificación requeridas, la liberación y el régimen que se va a administrar.

Como se usa en este documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier soporte, diluyente, adyuvante o vehículo, tales como agentes conservantes o antioxidantes, cargas, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, medios de dispersión,
20 revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para retrasar la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es conocido en la técnica. Excepto en caso de que algún medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones terapéuticas está contemplado. En las composiciones también
25 pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios como combinaciones terapéuticas adecuadas.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de dicho
30 trastorno o afección.

En términos generales, los compuestos de esta invención pueden proporcionarse en una solución acuosa de tampón fisiológico que contiene de 0,1 a 10 % p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de dosis típicas son de 1 µg/kg a 0,1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg de
35 peso corporal por día o una dosis equivalente en un niño. La dosificación preferida de

fármaco a administrar probablemente dependerá de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del compuesto, la vía de administración (intravenosa, intramuscular u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la vía de administración elegida y la velocidad (embolada o infusión continua) y el programa de administración (número de repeticiones en un periodo de tiempo dado).

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación unitarias, donde el término "dosis unitaria" significa una sola dosis que puede administrarse a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, permaneciendo como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el propio compuesto activo, o como una composición farmacéuticamente aceptable, como se describe más adelante en este documento. Como tales, los intervalos típicos de las dosis diarias totales son de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de pauta general, las dosis unitarias para los seres humanos varían de 1 mg a 3000 mg al día. Preferiblemente, el intervalo de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrados de una a seis veces al día, e incluso más preferiblemente de 10 mg a 500 mg una vez al día. Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas por medio de su mezcla con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Estas composiciones de dosis unitarias pueden prepararse para uso por administración oral, particularmente en forma de comprimidos, cápsulas sencillas o cápsulas de gel blando; o por vía intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, tópicamente o en pomadas, cremas, lociones, geles o pulverizaciones, o por medio de parches transdérmicos.

Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que un compuesto de la presente invención se formula para administración oral o parenteral.

Para la administración oral, los comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina o goma de tragacanto; un diluyente tal como almidón o lactosa; un disgregante tal como

almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta o salicilato de metilo. Las cápsulas pueden estar en forma de una cápsula dura o una cápsula blanda, que generalmente se preparan a partir de mezclas de gelatina opcionalmente combinadas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, Las formas de dosificación unitarias pueden contener otros diversos materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otras formas de dosificación orales tales como jarabes o elixires pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes y aromatizantes. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de disolución rápida, de liberación modificada o de liberación sostenida, siendo preferiblemente dichas formulaciones de liberación sostenida bimodales. Los comprimidos preferidos contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa sódica, povidona, estearato de magnesio o talco en cualquier combinación.

Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Las composiciones líquidas también pueden incluir agentes aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, edulcorantes, aromatizantes y colorantes, y similares. Los disolventes no acuosos incluyen alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios tamponados y solución salina. En particular, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos polímeros biocompatibles y biodegradables de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno. Los vehículos intravenosos pueden incluir fluidos y agentes para reponer nutrientes, agentes para reponer electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Otros sistemas de liberación parenteral que podrían ser útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Los modos alternativos de administración incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel para aplicación intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, grageas o pastillas y también pueden incluir una base aromatizada, tal como sacarosa y

goma arábica, y otros excipientes tales como glicocolato. Las formulaciones adecuadas para administración rectal preferiblemente se presentan como supositorios de una sola dosis, con un vehículo sólido, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica a la piel preferiblemente toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los vehículos que pueden usarse incluyen parafina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipófilas o soluciones acuosas tamponadas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

10

Citotoxicidad *In Vitro* de Conjugados Entre Agentes de Unión a Células y Profármacos de la presente invención

La citotoxicidad de los profármacos de la presente invención y sus conjugados con agentes de unión a células puede medirse tras escisión del grupo protector y conversión en el fármaco activo. La citotoxicidad frente líneas celulares no adherentes tales como Namalwa y HL60 puede medirse por retro-extrapolación de las curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher et al, 135 *J. Immunol.* 3648-3651 (1985). La citotoxicidad de estos compuestos frente a líneas celulares adherentes tales como A-375 y SCaBER se puede determinar por ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher et al, 102 *J. Cell Biol.* 1312-1319 (1986).

20

Agente Terapéutico y Método para Inhibir el Crecimiento de Poblaciones Celulares Seleccionadas

La presente invención proporciona también un agente terapéutico para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas, que comprende:

25

(a) una cantidad citotóxica de uno o más de los profármacos descritos anteriormente enlazados a un agente de unión a células, y

(b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

Similarmente, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto una población celular, o tejido sospechoso de contener células de dicha población celular seleccionada, con una cantidad citotóxica de un agente citotóxico que comprende uno o más de los profármacos anteriormente descritos enlazados a un agente de unión a células.

35

El agente citotóxico se prepara como se ha descrito anteriormente.

Se conocen bien vehículos, diluyentes y excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables y pueden determinarse por los expertos en la técnica como justifica la situación clínica.

- 5 Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) disolución salina de Dulbecco con tampón fosfato, pH alrededor de 7,4, que contiene alrededor de 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) 0,9% de sustancia salina (0,9% peso/volumen de NaCl), y (3) 5% (peso/volumen) de dextrosa.

- 10 El método para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas puede ponerse en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto variantes deseadas que no expresen el antígeno diana; o para destruir variantes que expresan un antígeno indeseado.

- 15 Las condiciones de uso no clínico *in vitro* se determinan fácilmente por un especialista en la técnica.

Los ejemplos de usos *ex vivo* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; y tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

- 20 El tratamiento clínico *ex vivo* para retirar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento de cánceres o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para retirar células T y otras células linfoides de médula ósea alogénica o de tejidos antes del trasplante para prevenir la GVHD, puede realizarse como se indica a continuación. Se recoge médula ósea del
25 paciente u otro individuo y después se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, en concentraciones que varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación (=dosis) se determinan fácilmente por el
30 especialista en la técnica. Después de la incubación, las células de médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. de acuerdo con métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de todo el cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas,
35 las células de médula ósea se conservan congeladas en nitrógeno líquido usando un

equipo médico convencional.

Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se suministrará como soluciones que se ensayan con respecto a la esterilidad y con respecto a los niveles de endotoxinas o como un sólido liofilizado que puede redisolverse en agua estéril para inyección. A continuación se proporcionan ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados. Los conjugados se administran semanalmente durante 6 semanas como una embolada i.v. Las dosis en embolada se administran en 50 a 400 ml de solución salina normal a la que puede añadirse albúmina de suero humano (por ejemplo, de 0,5 a 1 ml de una solución concentrada de albúmina de suero humano, 100 mg/ml). Las dosificaciones serán de aproximadamente 50 μ g a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (intervalo de 10 μ g a 100 mg/kg por inyección). Seis semanas después de tratamiento, el paciente puede recibir un segundo curso de tratamiento. El especialista en la técnica puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., cuando lo permita la situación.

Los ejemplos de situaciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de destrucción de poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; melanomas; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones virales tales como infección de CMV, infección de HIV, AIDS, etc.; infección bacteriana; e infecciones parasitarias tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras determinadas por un especialista en la técnica.

EJEMPLOS

La invención se ilustrará ahora por referencia a ejemplos no limitantes. A menos que se indique de otro modo, todos los porcentajes, proporciones, partes, etc. son en peso.

MATERIALES Y METODOS

Los puntos de fusión se midieron usando un aparato Electrothermal y no están corregidos. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker

AVANCE400 (400 MHz). Los desplazamientos químicos se indican en ppm con respecto a TMS como estándar interno. Los espectros de masas se obtuvieron usando un sistema Bruker Esquire 3000. Los espectros ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro Hitachi U1200. La cromatografía HPLC se realizó usando un sistema Beckman Coulter GOLD 125 equipado con un sistema Beckman Coulter con detector de longitud de onda variable GOLD 168 y un Waters Radialpak (una columna C-18 de fase reversa). Se realizó cromatografía en capa fina sobre placas TLC de gel de sílice Analtech GF. La gel de sílice para cromatografía flash en columna fue de Baker. Se secó tetrahidrofurano por destilación sobre sodio metálico. Se secaron dimetilacetamida y dimetilformamida por destilación sobre hidruro cálcico bajo presión reducida. Los otros disolventes usados fueron de grado reactivo o grado HPLC.

La síntesis de los profármacos DC07 (**7a**), DC08 (**8a**) y DC107 (**Fig. 4**) se describe aquí. DC07 y DC08 así como DC107 se obtienen del fármaco parental DC1 y DC101, mientras que DC09 (**9a**) puede prepararse a partir del fármaco DC5 parental pegilado que se describió en la patente de US 6.756.397 B2 (FIG. 3). El profármaco DC07 es extremadamente estable en disoluciones acuosas a pH 5,5 o inferior, y puede convertirse en el fármaco parental DC1 por incubación en suero o plasma. Estos fármacos también tienen mayor solubilidad en agua en comparación con DC1. La incubación de DC07SMe en suero de ratones lo convierte en el fármaco parental DC1SMe.

Las líneas celulares de cáncer humano HL60, Namalwa, A-375, COLO205 y Ramos se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Kara es una línea celular de tumor murino que se ha transfectado establemente con el antígeno humano CD33.

25

EJEMPLO 1

*Preparación de (S)-N-[2-[(1-chlorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonifenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditiopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC07-SMe, **7b**)*

A una disolución de 11,6 mg (0.017 mmol) de DC1SMe (1-[S]-(clorometil)-5-hidroxi-3-[[5-[5-(3-metilditiopropionil)indol-2-il-carbonilamino]indol-2-il] carbonil]-1,2-dihidro-3H-benc[e]indol) en 2,5 ml de DMA se añadieron 3,0 μ l de DIPEA. Tras agitación bajo Ar durante 3 min., se añadieron 4,0 mg de carbonildiimidazol (1,46 eq). La mezcla se agitó durante 2 horas y la TLC mostró que todo el DC1SMe se consumió, después se añadieron 16 mg (3 eq) de sal de 3-aminobencenosulfonato de

35

diisopropiletilamina (pH 5) de nueva preparación. La mezcla se agitó bajo Ar durante una noche y la cromatografía HPLC mostró la reacción completa. La mezcla se evaporó con bomba de aceite y se purificó con columna C-18 (1.0 x 5 cm) eluída con desde 100% de ácido acético al 0,01% a 50% de ácido acético al 0,01% y 50% de THF. Las fracciones se juntaron y evaporaron para producir 11,8 mg del compuesto del título (DC07SMe); ^1H NMR (DMF- d_7) 11,85 (br, 2H), 11,79 (s, 1H), 11,70 (s, 1H), 10,53 (s, 1H), 10,27 (s, 1H), 10,03 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,21 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 8,17 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8,12 (m, 1H), 7,46 (dd, 1H, $J = 1.9, 8.8$ Hz), 7,66 (m, 2H), 7,61 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz), 7,58 (m, 2H), 7,48 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 7,45 (dd, 1H, $J = 1.9, 8.8$ Hz), 7,35 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5,01 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz), 4,84 (dd, 1H, $J = 2.2, 10.9$ Hz), 4,49 (m, 2H), 4,21 (dd, 1H, $J = 3.2, 11.3$ Hz), 4,10 (m, 2H), 3,12 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2,49 (s, 3H); ^{13}C NMR 172,52, 170,33, 169,54, 162,94, 161,20, 160,41, 152,67, 147,94, 142,69, 139,11, 134,73, 134,56, 133,72, 133,37, 133,18, 132,16, 130,72, 128,76, 128,41, 128,34, 125,71, 125,61, 124,07, 123,16, 121,51, 120,05, 118,36, 113,54, 112,97, 112,92, 112,16, 111,61, 108,14, 107,56, 106,78, 104,02, 69,03, 67,95, 67,37, 55,84, 54,91, 48,13, 42,71, 37,05, 34,10, 23,12; MS m/z^+ 831,14 ($M + H$) $^+$, 883,0, 883,9, 884,9 ($M + Na$) $^+$, 905,0, ($M + K$) $^+$ 920,9, 922,9; MS m/z^- 880,8, 881,8, 882,8, 883,8 ($M - H$) $^-$.

20 EJEMPLO 2

Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonifenil)-aminocarbonilo]oxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC07, 7a)

Una disolución de 10 mg (0,104 mmol) de TCEP en 2 ml de H_2O se ajustó a pH 7,0 con adición de NaHCO_3 en polvo. A la disolución se añadió 15 mg de DC07SMe en 3 ml de DMA seguido por adición de 5 mg de DTT en 1,0 ml de NaH_2PO_4 200 mM, pH 4,5. Después de 2 horas de agitación y tras mostrar la espectrometría MS que el pico de DC07SMe (m/z 883 ($M-1$)) desapareció, la mezcla se concentró y purificó con columna c-18 de HPLC preparativa eluída desde 60% de NaH_2PO_4 10 mM y 40% de DMA a 80% de DMA en 40 min. Las fracciones recogidas se juntaron, concentraron, redisolviaron en DMA, se filtraron las sales, se evaporaron nuevamente para proporcionar 13 mg de DC07. MS m/z^- 835,1 ($M-H$), 836,1, 837,1, 838,1

EJEMPLO 3

35 *Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-*

fenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il}carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[[3-(2-piridilditio)-propanoil]-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC08SPy):

A 21,0 mg de (DC1SPy) en 2 ml de DMA se añadieron 10 microlitros de diisopropiletilamina (DIPEA). Tras agitar durante 3 min bajo Ar, se añadieron 8,0 mg de carbonildiimidazol (CDI), y la mezcla se agitó durante 2 horas, se analizó por HPLC en columna C-18, el DC1Spy reaccionó completamente con CDI. A la mezcla se añadieron 20 mg de ácido 4-aminobencilsulfónico y 10 microlitros de DIPEA. Tras agitación durante una noche, la mezcla se concentró y purificó por HPLC en columna C-18 eluída desde 30% de DMA en NaH₂PO₄ 10 mM, pH 4,0 a 80% de DMA en NaH₂PO₄ 10 mM, pH 4,0. Las fracciones se juntaron, concentraron para proporcionar 20,2 mg del compuesto del título. ¹H NMR (DMF-d₇) 11,67 (d, 2H, J = 9,9 Hz), 10,58 (s, 1H), 10,23 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 8,86 (dddd, 1H, J = 0,8, 1,6, 2,5, 14,6), 8,41 (s, 1H), 8,27 -8,20 (m, 4H), 8,12 (m, 1H), 7,95 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,83 (m, 1H), 7,71 (dd, 1H, J = 2,0, 9,9 Hz), 7,60 – 7,51 (m, 4H), 7,47 – 7,40 (m, 4H), 7,30 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 4,90 (t, 1H, J = 10,0 Hz), 4,75 (dd, 1H, J = 2,2, 10,9 Hz), 4,33 (m, 1H), 4,15 (dd, 1H, J = 3,2, 11,3 Hz), 4,11 (s, 2H), 3,97 (dd, 1H, J = 7,8, 11,0 Hz), 3,29 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 2,76 (m, 3H); ¹³C NMR 172,35, 162,93, 161,20, 160,41, 155,77, 151,36, 147,94, 142,69, 140,14, 139,11, 134,73, 134,56, 133,82, 133,37, 132,97, 132,16, 131,49, 129,22, 128,82, 128,34, 125,01, 125,61, 124,17, 123,76, 121,81, 120,05, 119,32, 116,43, 113,31, 112,97, 112,92, 112,16, 111,61, 108,14, 107,56, 106,83, 101,78, 67,37, 56,37, 48,13, 42,71, 37,00, 34,10; MS m/z⁺ 958,34 (M-1).

Acido 4-aminobencilsulfónico:

En una botella de hidrogenación Par de 250 ml se cargó ácido 4-nitrobencilsulfónico (6,80 g, 31,34 mmol), 10% Pd/C (0,4 g), CH₃OH (150 ml) con unas gotas de agua y se purgó con hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó con H₂ a 14060 Kg/m² durante una noche. El catalizador se separó por filtración mediante celita y se evaporó el disolvente. El compuesto no purificado se coevaporó tres veces con 3 x 50 ml de agua y se recrystalizó con agua/THF/EtAc/Tolueno (1:10:10:100) para dar 5,3 g (91%) del compuesto del título. ¹H NMR (D₂O), 7,28(dd, 2H, J = 2,2, 4,3 Hz), 6,95 (dd, 2H, J = 2,2, 4,3 Hz), 4,10 (s, 2H); ¹³C NMR 134,30, 127,10, 121,04, 120,42, 59,14; MS m/z⁺ 186,35 (M -H).

Tiolacetato de 4-nitrofenilo:

A la disolución de 5 ml (69,95 mmol) de ácido tiolacético y 12 ml de trietilamina

en 75 ml de tolueno se añadió gota a gota 7,5 g (34,71 mmol) de bromuro de 4-nitrobencilo en 100 ml de THF/Tolueno 1:2 durante 4 horas. La mezcla se agitó continuamente durante una noche, se evaporó y cristalizó con EtAc/Tolueno/Hexano para proporcionar 7,1 g (96%) del compuesto del título. ¹H NMR (CDCl₃) 8,13 (ddd, 2H, J = 2,5, 4,5, 9,3 Hz), 7,44 (ddd, 2H, J = 2,5, 4,5, 9,3 Hz), 4,14 (s, 2H), 2,35 (s, 3H); ¹³C NMR 194,53, 145,73, 129,91, 124,07, 32,93, 30,50; MS M⁺ 234,34 (M + Na).

Acido 4-nitrobencilsulfónico:

Se añadieron 7,0 g de tiolacetato de 4-nitrofenilo en 150 ml disolución H₂O₂/HAc 1:3 en 5 porciones durante 4 h y la mezcla se agitó continuamente durante una noche. La mezcla se evaporó y coevaporó tres veces con 3 x 50 ml de agua, se cristalizó con CH₃OH/THF/Tolueno para proporcionar 6,82 g (95%) del compuesto del título. ¹H NMR (D₂O) 8,02 (ddd, 2H, J = 2,7, 4,6, 11,1 Hz), 7,20 (ddd, 2H, J = 2,6, 4,6, 11,1 Hz), 4,11 (s, 2H); ¹³C NMR 141,70, 139,30, 129,91, 122,07, 59,15; MS m/z 216,21 (M - H)

EJEMPLO 4

Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC08)

Una disolución de 10 mg (0,104 mmol) de TCEP en 2 ml de H₂O se ajustó a pH 7,0 con adición de NaHCO₃ en polvo. A la disolución se añadieron 15 mg de DC08SPy en 3 ml de DMA seguido por adición de 5 mg de DTT en 1,0 ml de NaH₂PO₄ 200 mM, pH 4,5. Después de 2 horas de agitación y, tras mostrar la espectrometría MS que el pico de DC08SPy (m/z 883 (M-1)) desapareció, la mezcla se concentró y purificó con columna c-18 de HPLC preparativa eluida desde 60% de NaH₂PO₄ 10 mM/40% de DMA a 20% de NaH₂PO₄ 10 mM/80% de DMA en 40 min. Las fracciones recogidas se juntaron, se concentraron a sequedad, se redisolvieron en DMA, se filtraron las sales, se evaporaron nuevamente para proporcionar 13 mg de DC08. MS m/z 849,1 (M-H), 850,1, 851,1.

EJEMPLO 5

(S)-N-(2-(1-(clorometil)-5-hidroxi-2,3-dihidro-1H-benc[e]indol-3-carbonil)-1H-indol-5-il)-3-(metildisulfanil)propanamida (DC101SMe)

A una disolución de sal hidrocioruro de 5-hidroxi-3-amino-1-[S]-(clorometil)-1,2-

dihidro-3H-benc(e)indol (155 mg, 0,57 mmol) y ácido 5-(3-(metil-
disulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carboxílico (170 mg, 0,55 mmol) en 7,0 ml de DMA
se añadió EDC (300 mg, 1,56 mmol) bajo Ar. Tras agitar durante una noche, la mezcla
se evaporó a sequedad, se purificó por cromatografía de SiO₂ (20% a 40% de THF en
5 tolueno) y se cristalizó con THF/Tolueno/Hexano para proporcionar 218 mg (76%) de
DC₁₀₁SMe. ¹H NMR (DMF-d₇) 11,63 (s, 1H), 10,56 (s, 1H), 9,95 (s, 1H), 8,23 (s, 2H),
7,93 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,56 (dd, 1H, J = 2,0, 8,1 Hz), 7,52 (s, 1H), 7,47 (dd, 1H, J =
1,9, 8,9 Hz), 7,41 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 7,25 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 4,88 (dd, 1H, J = 8,7,
11,0 Hz), 4,73 (dd, 1H, J = 2,3, 10,9 Hz), 4,31 (m, 1H), 4,12 (dd, 1H, J = 3,1, 11,0 Hz),
10 3,95 (dd, 1H, J = 8,4, 11,2 Hz), 3,21 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,71 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,45 (s,
3H); ¹³C NMR 169,54, 161,06, 155,36, 134,21, 133,39, 132,54, 131,05, 128,39,
127,99, 123,98, 123,74, 123,46, 123,31, 118,88, 115,99, 112,87, 112,31, 106,40,
101,33, 55,93, 48,10, 42,61, 36,92, 30,81, 25,34. MS m/z+ 548,2 (M+Na), 550,2
(M+2+Na).

15

Acido 5-(3-(metildisulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carboxílico

A la disolución de ácido 3-(metildisulfanil)propanoico (1,18 g, 7,76 mmol) en 50
ml de DMA se añadió hidroxisuccinimida (1,14 g, 9,90 mmol) y EDC (1,91 g, 9,96
mmol) bajo argón. La mezcla se agitó durante una noche. Tras confirmar la
20 terminación por TLC (1:6 EtAc/Hexano), la mezcla se usó directamente para la
próxima etapa sin purificación adicional.

A la disolución de ácido 5-amino-1H-indol-2-carboxílico (1,32 g, 7,49 mmol) en
50 ml de Na₂HPO₄ 0,5 M, pH 8,0/DMA 1:4 a 0°C se añadió gota a gota en 1 h la
disolución de éster NHS anteriormente preparada. Tras la adición, la mezcla se agitó
25 continuamente a 4°C durante 1 h y después TA durante 1 h. La mezcla se concentró y
purificó por cromatografía de SiO₂ eluída con THF/Tolueno/Acido acético (1:4:02% a
1:2:0,02%) para proporcionar el producto del título (1,62 g, 70%). ¹H NMR (DMF-d₇)
12,80 (br, 0,8 H), 11,66 (s, 1H), 9,96 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,44 (s, 2H), 7,14 (d, 1H, J =
2,0 Hz), 3,20 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 2,72 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 2,37 (s, 3H). ¹³C NMR
30 169,53, 163,45, 135,24, 133,38, 130,12, 127,99, 119,13, 113,10, 112,27, 108,04,
36,88, 30,60. MS m/z 309,20 (M-1).

EJEMPLO 6

Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-(metildisulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carbonil)-
35 *2,3-dihidro-1H-benco[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico (DC107SMe)*

A una disolución de DC101SMe ((S)-N-(2-(1-(clorometil)-5-hidroxi-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-3-carbonil)-1H-indol-5-il)-3-(metildisulfanil)propanamida, (100 mg 0,19 mmol en 10 ml de DMA) se añadió DIPEA (35 μ l, 0,20 mmol). Después de agitada bajo Ar durante 3 min., se añadieron 32,0 mg (0,20 mmol) de carbonildiimidazol. La mezcla se agitó durante 2 horas y la TLC mostró que todo el DC101SMe se consumió, después se añadió sal de 3-aminobenzenosulfonato de diisopropiletilamina (65 mg, 0,21 mmol) de nueva preparación. La mezcla se agitó bajo Ar durante 24 h y la HPLC mostró la reacción completa para formar DC107SMe [ácido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-(metil-isulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)benzenosulfónico]. La mezcla se concentró a ~ 5 ml con bomba de aceite y se usó directamente para la próxima etapa sin purificación adicional.

EJEMPLO 7

15 *Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)benzenosulfónico(DC107)*

A la anterior disolución concentrada se añadieron 60 mg (0,62 mmol) de TCEP en 10 ml de DMA/NaH₂PO₄ 0,4 M 1:1, pH 4,0. Tras agitación bajo Ar durante 4 h la mezcla se concentró y purificó con columna C18 eluida con desde 90% de ácido acético al 0,01% en DMA a 40% de ácido acético al 0,01% en DMA. Las fracciones se juntaron y evaporaron para proporcionar 94 mg (73%, dos etapas) de ácido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)benzenosulfónico (DC107). ¹H NMR (DMF-d₇) 11,63 (s, 1H), 10,51 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 8,33 (s, 2H), 7,93 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,58 (m, 2H), 7,52 (m, 2H), 7,47 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 7,38 (m, 1H), 7,25 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 4,87 (dd, 1H, J = 8,7, 11,0 Hz), 4,74 (dd, 1H, J = 2,3, 10,9 Hz), 4,32 (m, 1H), 4,12 (dd, 1H, J = 3,0, 11,0 Hz), 3,93 (dd, 1H, J = 8,4, 11,2 Hz), 3,21 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,70 (t, 2H, J = 7,1 Hz); ¹³C NMR 169,55, 161,30, 155,46, 150,21, 143,45, 134,22, 133,37, 132,54, 131,35, 130,31, 128,38, 127,95, 123,78, 123,72, 123,48, 123,33, 121,41, 118,88, 115,90, 112,88, 112,35, 106,44, 101,38, 55,95, 48,60, 42,67, 36,90, 25,01. MS m/z- 676,90 (M-H), $\epsilon_{340\text{ nm}} = 19025\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

35 **Conjugación de DC07 a anticuerpos monoclonales.** El anticuerpo huMy9-6 que se une al antígeno CD33 expresado preferentemente en la superficie de células AML humanas se seleccionó para la conjugación de DC07.

EJEMPLO 8

Preparación de huMy9-6-SSNPB-DC07: un conjugado enlazado por disulfuro

En la primera etapa, el anticuerpo se hizo reaccionar con el agente modificador 5-nitro-2-piridilditiobutanoato de N-sulfosuccinimidilo (SSNPB) para introducir grupos nitropiridilditio. Una disolución de anticuerpo huMy9-6 a una concentración de 8,5 mg/ml en un tampón acuoso que contiene fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, dimetilacetamida (DMA) al 3%, pH 6,5, se trató con un exceso molar 7,5 veces de una disolución de SSNPB (20 mM de provisión en DMA). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 90 min y se purificó en una columna pre-rellena de Sephadex G25 que había sido equilibrada previamente en un tampón acuoso que contenía NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 50 mM, pH 6,5. La muestra purificada produjo 98% de producto. Una parte alícuota pequeña del anticuerpo modificado se trató con ditioneitol para escindir el disulfuro de nitro-piridilo y la nitro-piridin-2-tiona liberada se analizó espectrofotométricamente: $\epsilon_{325nm} = 10,964 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 3,344 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para nitro-piridin-2-tiona, y $\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el anticuerpo. Se enlazaron una media de 5,0 grupos nitropiridildisulfuro por molécula de anticuerpo.

El anticuerpo modificado se diluyó a 2,0 mg/ml en el tampón anterior a pH 6,5 con DMA al 5% y después se trató con una disolución de DC07 en DMA, con un exceso de fármaco de 2,5 fármacos por enlazador. La mezcla de conjugación reaccionó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se purificó por paso a través de una columna de filtración de gel Sephacryl S300 que se había equilibrado previamente en DMA al 20%, NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 50 mM, pH 5,0. Las fracciones que contenían conjugado del anticuerpo DC07 monomérico se juntaron y dializaron en Citrato 10 mM, NaCl 135 mM, pH 5,0. El conjugado final se analizó espectrofotométricamente usando los coeficientes de extinción siguientes: $\epsilon_{340nm} = 38,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280nm} = 23,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el fármaco, y $\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el anticuerpo. El conjugado contenía 3,5 fármacos por anticuerpo.

EJEMPLO 9

Preparación de huMy9-6-SMCC-DC07: un conjugado enlazado por tioéter

En la primera etapa, el anticuerpo se hizo reaccionar con el agente modificador 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC). Una disolución de anticuerpo huMy9-6 a una concentración de 8,5 mg/ml en un tampón acuoso que contenía fosfato potásico 0,05 M, cloruro sódico 0,05 M y ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, DMA al 3%, pH 6,5, se trató con un exceso molar 8,5 veces de una disolución de SMCC (20 mM en DMA) a temperatura ambiente durante 90 min. El anticuerpo modificado se purificó en una columna pre-rellena de Sephadex G25 que se había equilibrado previamente en un tampón acuoso que contenía NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 50 mM, pH 6,5. La muestra purificada se analizó espectrofotométricamente ($\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para calcular la concentración de anticuerpo. La concentración de enlazador unido se determinó por un procedimiento establecido que mide indirectamente la cantidad de enlazador disponible para reacción con el aminoácido que contiene tiol, cisteína. Se habían determinado que había 6,0 enlazadores por anticuerpo postmodificación.

El anticuerpo modificado se diluyó a 2,0 mg/ml en NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 50 mM, DMA al 5%, pH 6,5 y se trató con DC07 0,20 mM (2,5 mol DC07/enlazador). La reacción de conjugación se dejó proceder a temperatura ambiente durante 80 minutos. La reacción se acidificó después con ácido acético al 5% y se sometió a análisis usando un sistema HPLC equipado con una columna analítica de exclusión por tamaños (SEC) equilibrada en DMA al 20%, NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 50 mM, pH 5,0, que permitió la separación de conjugado anticuerpo-fármaco de DC07 no reaccionado. El eluyente de la columna se controló en cuanto a absorbancia a 280 nM y 340 nM. La relación de DC07 a anticuerpo se determinó espectrofotométricamente que era 3,5. ($\epsilon_{340nm} = 38,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280nm} = 23,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el fármaco, y $\epsilon_{280nm} = 206,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el anticuerpo)

Cálculo de la relación Fármaco/Ab a partir del análisis SEC:

DC07 = $A_{340}/38000$

huMy9-6 = $[(A_{280} - (23000 * A_{340})) / 38000] / 206460$

Fármaco/Ab = DC07/My9-6

EJEMPLO 10

Resultados biológicos

• La citotoxicidad de DC07-SMe (Fig, 2) y DC1-SMe (Fig, 1D) frente a células Ramos y HL60/S se ha medido *in vitro* con exposición de 5 días. Los resultados se dan en la Fig. 6. Los valores IC50 se muestran a continuación.

Concentración (M)		
Línea celular	DC1-SMe	DC07-SMe
HL60/s	$3,6 \times 10^{-11} \text{ M}$	$5 \times 10^{-11} \text{ M}$
Ramos	$6,2 \times 10^{-11} \text{ M}$	$1,2 \times 10^{-10} \text{ M}$

▪ Se ha medido la citotoxicidad de DC1-SPy y DC07-SPy frente a células Ramos y HL60. Los resultados se dan en la Fig. 7 y los valores IC50 se dan a continuación.

DC1-SPy:

Línea celular	IC50 (μM)
Ramos	$7,5 \times 10^{-12}$
HL60	$7,5 \times 10^{-12}$

DC07-SPy:

Línea celular	IC50 (μM)
Ramos	$2,8 \times 10^{-11}$
HL60	$2,0 \times 10^{-11}$

5

▪ Se ha medido la citotoxicidad de DC08-SSPy frente a células Namalwa y Ramos. Los resultados se dan en la Fig. 8 y los valores IC50 se dan a continuación.

Línea celular	IC50 (μM)
Namalwa	$4,2 \times 10^{-10} \text{ M}$
Ramos	$4,2 \times 10^{-10} \text{ M}$

10 ▪ Se ha medido la citotoxicidad de MY9-6-DC07 (enlazado por disulfuro) frente a células Kara positivas para el antígeno y células Ramos negativas para el antígeno. Los resultados se dan en la Fig. 9 y los valores IC50 se muestran a continuación.

Línea celular	IC50 (μM)
Kara	$8,006 \times 10^{-13} \text{ M}$
Ramos	$1,015 \times 10^{-9} \text{ M}$

15 ▪ Se ha medido la citotoxicidad de huC242-DC07 (enlazado por tioéter) frente a células COLO 205 positivas para el antígeno y células A-375 negativas para el antígeno. Los resultados se dan en la Fig. 10 y los valores IC50 se muestran a continuación.

Línea celular	IC50 (μM)
COLO 205	$3,5 \times 10^{-11} \text{ M}$
A-375	$1,3 \times 10^{-9} \text{ M}$

Ciertas patentes y publicaciones impresas han sido referidas en la presente descripción, cuyas enseñanzas se incorporan aquí cada una en sus respectivas integridades por referencia.

Aunque la invención se ha descrito con detalle y con referencia a sus
5 realizaciones específicas, resultará evidente al experto en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en ello sin salir de su sentido y alcance.

10

15

20

25

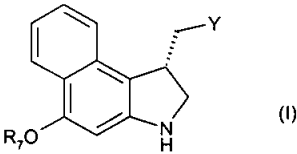
30

35

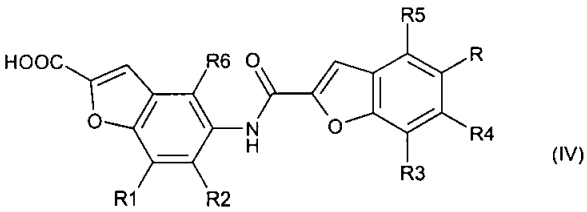
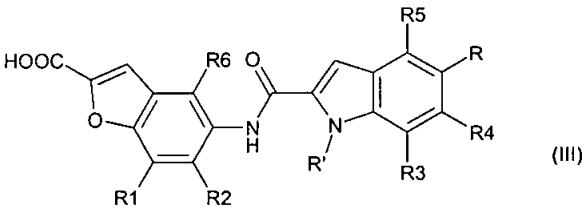
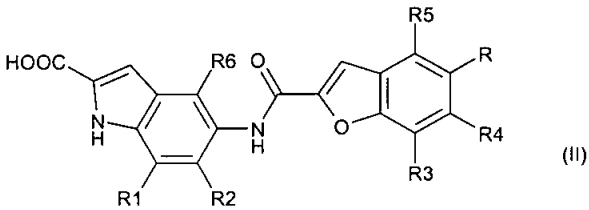
REIVINDICACIONES

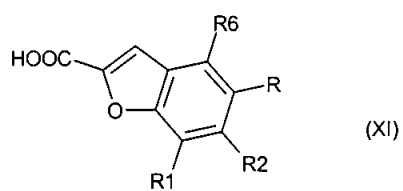
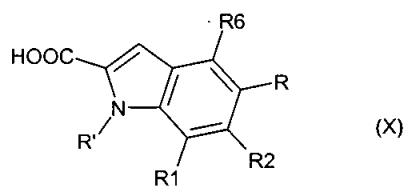
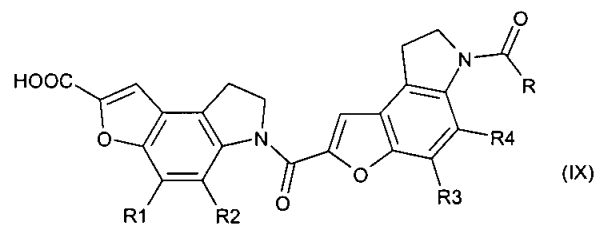
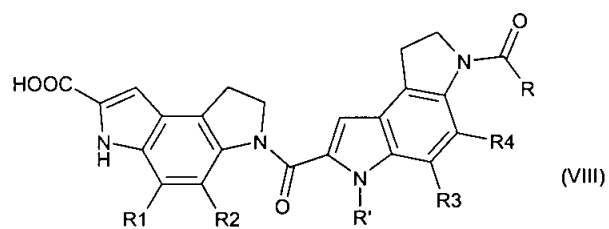
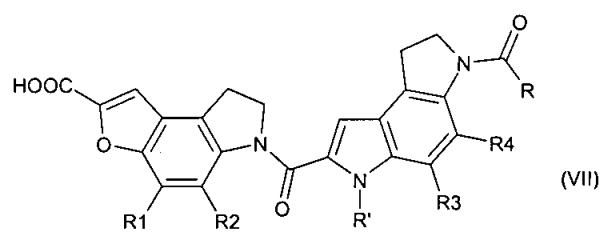
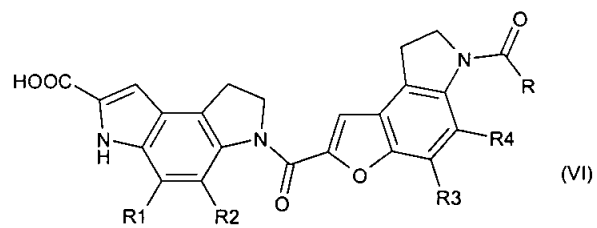
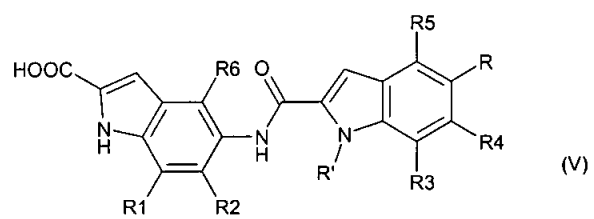
1. Un profármaco que comprende un análogo de CC-1065 en el que el grupo
fenónico de la parte alquilante de la molécula está protegido por un grupo protector que
5 aumenta la solubilidad en agua de dicho profármaco, y en donde dicho profármaco
comprende además un enlazador capaz de conjugar dicho profármaco a un agente de
unión a células, caracterizado porque dicho grupo protector es un ácido sulfónico que
contiene carbamato.

10 2. Un profármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análogo de
CC-1065 se selecciona del grupo consistente en análogos formados a partir de una
primera subunidad de fórmula (I) covalentemente enlazada a una segunda subunidad
de la fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) o (XI) a través de un enlace
amida desde el grupo amino secundario del resto pirrólico de la primera subunidad al
15 carboxilo C-2 de la segunda subunidad, en donde la fórmula (I) es como sigue:



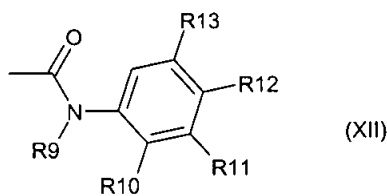
en donde las fórmulas (II)-(XI) son como sigue:





en las que Y representa un grupo eliminable seleccionado de un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro), metanosulfonato, para-toluenosulfonato, trifluorometanosulfonato, mononitro- o dinitrofenolato;
en donde R, R', R₁-R₆ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo-C₁-C₃
5 lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario, o amido o un enlazador que proporciona enlace del profármaco a un agente de unión a células, con tal de que al menos uno de R, R', R₁-R₆ sea un enlazador.
y en donde R₇ es dicho grupo protector de ácido sulfónico que contiene carbamato, o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, o sales hidratadas, o las
10 estructuras cristalinas polimórficas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereoisómeros o enantiómeros.

3. El profármaco de la reivindicación 2, en donde R₇ es un ácido sulfónico que contiene carbamato de fenilo de fórmula general XII:



15 en donde R₉ es H o un alquilo ramificado, cíclico o lineal, R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ son idénticos o diferentes con al menos uno siendo un grupo -X-SO₃⁻M⁺ con M⁺ siendo H⁺ o el catión que se deriva de un átomo del grupo IA, y siendo X un enlace directo, o un espaciador elegido de alquileno, alquenil o alquinil C1 a C4 lineal o ramificado, un -
20 Oalquil-, -Salquil- y aminoalquilo y los otros R₁₀, R₁₁, R₁₂ o R₁₃ son H, un alquilo-C₁-C₆ ramificado o lineal, -Oalquilo, -Salquilo, hidroxilo, amino primario, amino secundario, o amido, haluro, nitro, azido.

25 4. El profármaco de acuerdo con la reivindicación 3, en donde R₉=H.

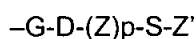
5. El profármaco de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde uno de R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃= -X-SO₃⁻M⁺ y los otros son H.

30 6. El profármaco de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 5, en donde R', R₁-R₆ son hidrógeno y R es un enlazador.

7. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho enlazador comprende un sustituyente que contiene tiol, sulfuro o un enlace disulfuro.

5 8. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho enlazador comprende un poli(etilenglicol) de la fórmula - $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ -, en donde n es un número entero de 1 a 2000.

9. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho grupo enlazador es de fórmula:



en la que

G es un enlace sencillo o doble, -O-, -S- or -NT-;

D es un enlace sencillo is o -E-, -E-NT-, -E-NT-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NT-CO-, -E-NT-
15 CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NT-C-S-, -E-NT-CS-F-;

En donde T es H o un alquilo- C_1 - C_6 ramificado o lineal;

donde E y F son iguales o diferentes y se eligen independientemente entre -

$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Alquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ - lineal o ramificado, -Alquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ -Alquil-,

- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ -, - $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Cicloalquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -,

20 - $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Heterocíclico $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -, - $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Aril $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -,

- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Heteroaril $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -, -Alquil- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Alquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -,

-Alquil- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ -, -Alquil- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Cicloalquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -,

-Alquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Heterocíclico $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -, -Alquil- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Aril $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -,

-Alquil $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_i$ Heteroaril $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_j$ -, -Cicloalquil-Alquil-, -Alquil-Cicloalquil-,

25 -Heterocíclico-Alquil-, -Alquil-Heterocíclico-, -Alquil-Aril-, -Aril-Alquil-,

-Alquil-Heteroaril-, -Heteroaril-Alquil-;

donde i y j, iguales o diferentes, son números enteros y se eligen independientemente entre 0, 1 a 2000;

Z es -Alquil- lineal o ramificado;

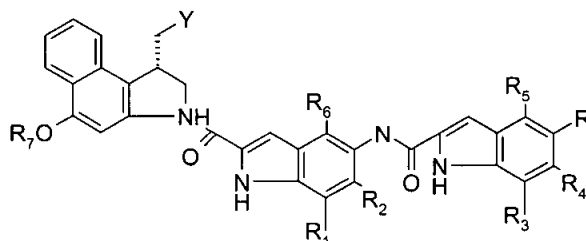
30 p es 0 ó 1;

Z' representa H, un grupo protector de tioles tal como COR, R_{20} or SR_{20} , en donde R_{20} representa H, metilo, alquilo, y cicloalquilo, arilo, heteroarilo o heterociclo opcionalmente sustituidos.

10. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 9, en donde G es un enlace sencillo o -NT-.
11. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en donde G es -NT-.
- 5 12. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 9, 10 ó 11, en donde D es -CO-E-.
13. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde E es un -Alquilo- lineal o ramificado.
- 10 14. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde p es 0.
- 15 15. Compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde Z' es H o SR₂₀, en donde R₂₀ representa alquilo o heteroarilo.
16. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, en donde dicho enlazador se elige de (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nSZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCH(Me)SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pO(CH₂)_mC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCO(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pNHCOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCH(Me)SZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nCHMeSZ, (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_mCMe₂SZ or (CH₂)_pOC₆H₄(CH₂)_m(OCH₂CH₂)_nC(Me)₂SZ, en donde: Z representa H, un grupo protector de tioles tal como a Ac, R₈ or SR₈, en donde R₈ representa metilo, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo o heterociclo simple o sustituido, y m representa un número entero de 0 a 10, n representa un número entero de 0 a 2000, p representa un número entero de 0 a 10.
- 20
- 25
- 30

17. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, en donde dicho enlazador se elige de $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2SH$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2C(Me)_2SH$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2SSCH_3$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nSH$, $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nC(Me)_2SSCH_3$ y $(CH_2)_pNHCO(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nSSMe$.

18. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17, en donde consiste en la fórmula:



10 en donde Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R están definidos como en las reivindicaciones 2 a 17, y en donde R es un enlazador como se ha definido en las reivindicaciones 7-17,
o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos,
15 racematos, diastereómeros o enantiómeros,

19. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es:

(S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxi-sulfonifenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditiopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

(S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonifenil)-aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercpto-propanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida

25 (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-(2-piridilditio)-propanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

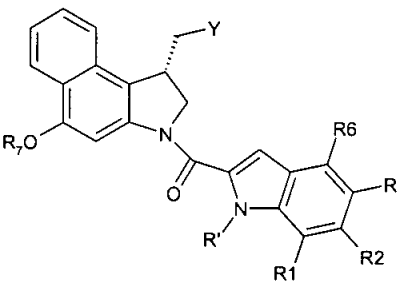
(S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercpto-propanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

30 indol-2-carboxamida,

(S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(3-hidroxisulfonilmetil-fenil)aminocarboniloxi]-3H-benc(e)indol-3-il)carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropanoil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

20, El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde consiste en la fórmula:



en donde Y, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ y R están definidos como en las reivindicaciones 2 a 17, y en donde R es un enlazador como se ha definido en las reivindicaciones 7-17,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

21. El profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, 20 que es:

Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-mercaptopropanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico,

Acido (S)-3-((1-(clorometil)-3-(5-(3-(metildisulfanil)propanamido)-1H-indol-2-carbonil)-2,3-dihidro-1H-benzo[e]indol-5-iloxi)carbonilamino)bencenosulfónico,

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas, o las estructuras polimórficas cristalinas de estos compuestos o sus isómeros ópticos, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

22. Un profármaco conjugado que comprende un agente de unión a células enlazado a uno o más de los profármacos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes a través de un grupo enlazante.

23. Los conjugados profármacos de la reivindicación 22, en donde dichos agentes de unión a células se eligen de anticuerpos y sus fragmentos, interferones, linfoquinas, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento.

5 24. Los conjugados profármacos de la reivindicación 22 ó 23, en donde dichos agentes de unión a células son anticuerpos o sus fragmentos.

25. El conjugado profármaco de acuerdo con la reivindicación 22, 23 ó 24, en donde el grupo enlazante comprende el enlazador enlazado a una función reactiva
10 frente a tiol, sulfuro o disulfuro.

26. Una composición farmacéutica que comprende el profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

15 27. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

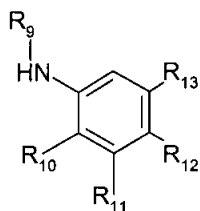
20 28. Uso de un profármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

29. Uso de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

25 30. Procedimiento de preparación de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 que comprende la etapa de proteger el grupo fenólico de la parte alquilante del correspondiente análogo de CC-1065 por un ácido sulfónico que contiene la función carbamato.

30 31. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 30, en donde esta reacción se realiza con CDI/DMA (carbonildiimidazol/dimetilamina) y el correspondiente amino-fenilsulfonatoderivado de fórmula:

54



en donde R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ R₁₃ están definidos como en la reivindicación 3.

32. El procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31,
5 que comprende además la etapa de hidrolizar el producto obtenido.

33. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30
a 32, que comprende además la etapa de aislar el producto deseado.

10 34. Procedimiento de preparación de un conjugado de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 que comprende la etapa en donde un
análogo de CC-1065 como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1
a 21 que comprende un grupo sulfuro, disulfuro o tiol se hace reaccionar con un
15 agente de unión a células que comprende una función reactiva hacia sulfuro, disulfuro
o tiol de manera que el análogo y el agente de unión a células están enlazados
conjuntamente a través de un enlace covalente sulfuro o disulfuro.

FIGURA 1

FIG. 1A
TECNICA ANTERIOR

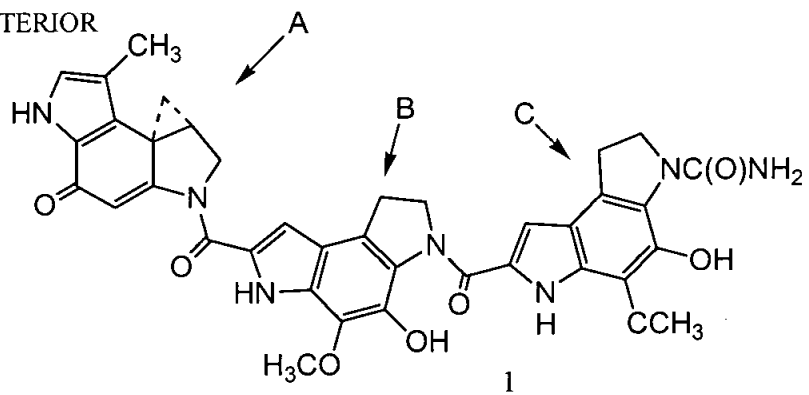


FIG. 1B
TECNICA ANTERIOR

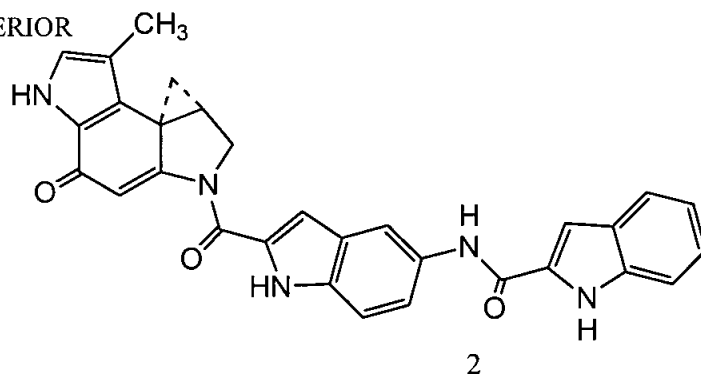
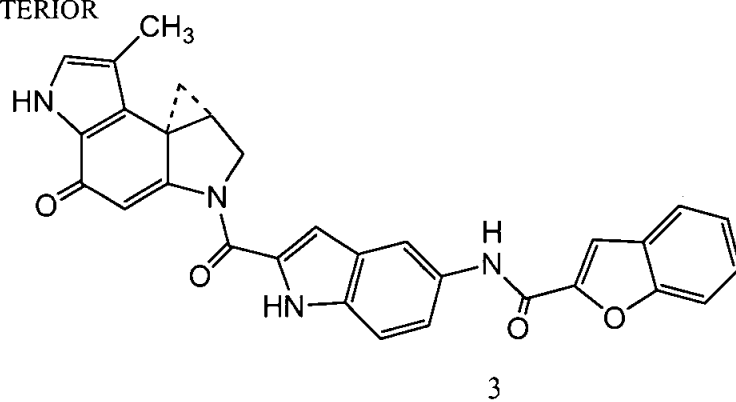
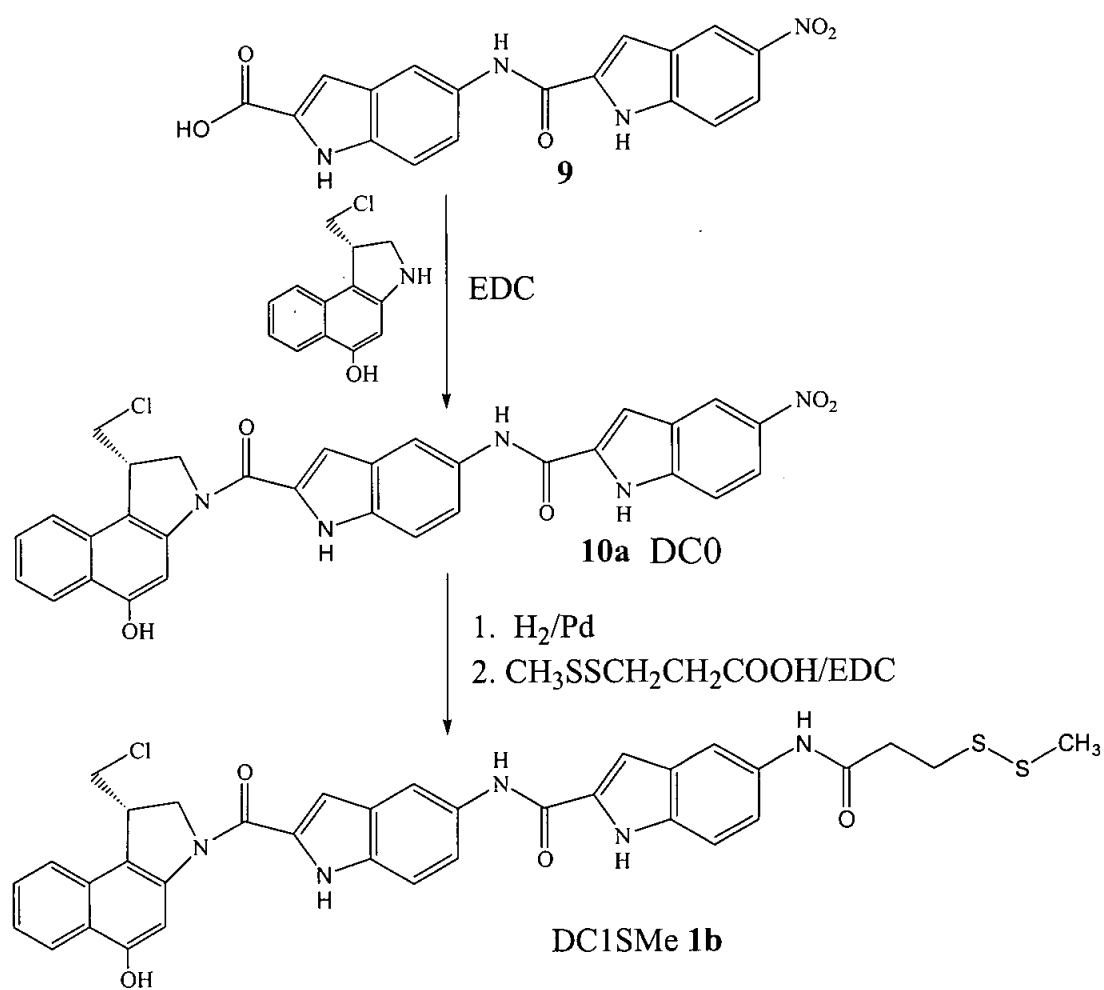


FIG. 1C
TECNICA ANTERIOR



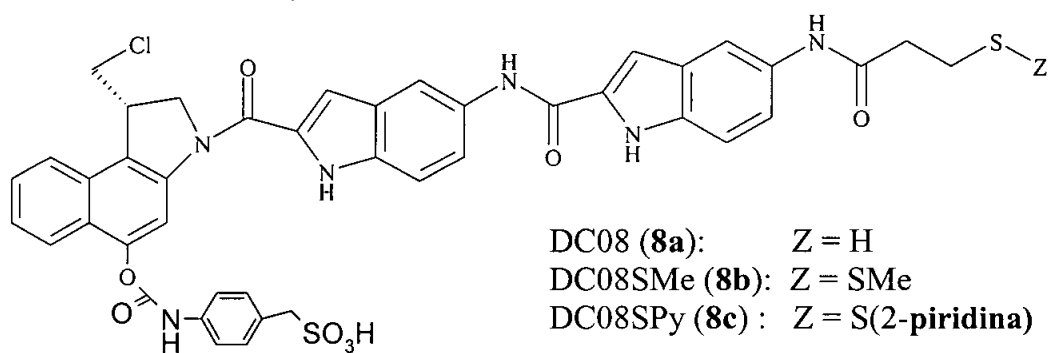
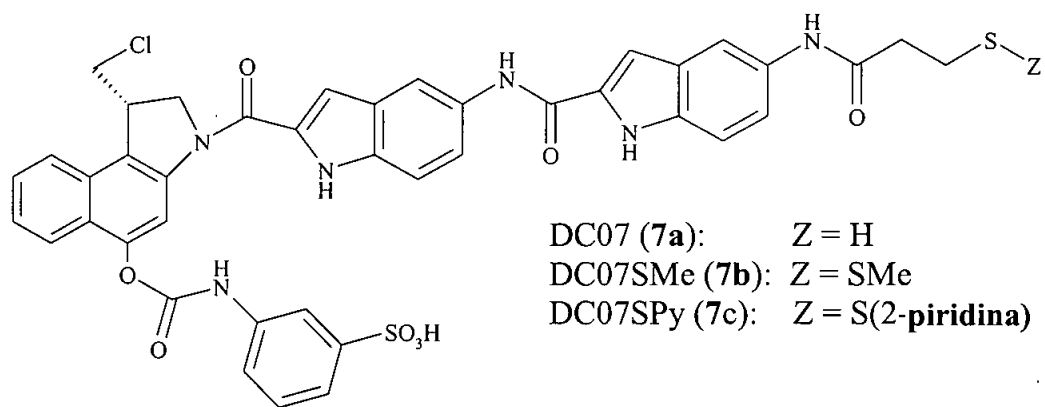
2/14

FIGURA 1D



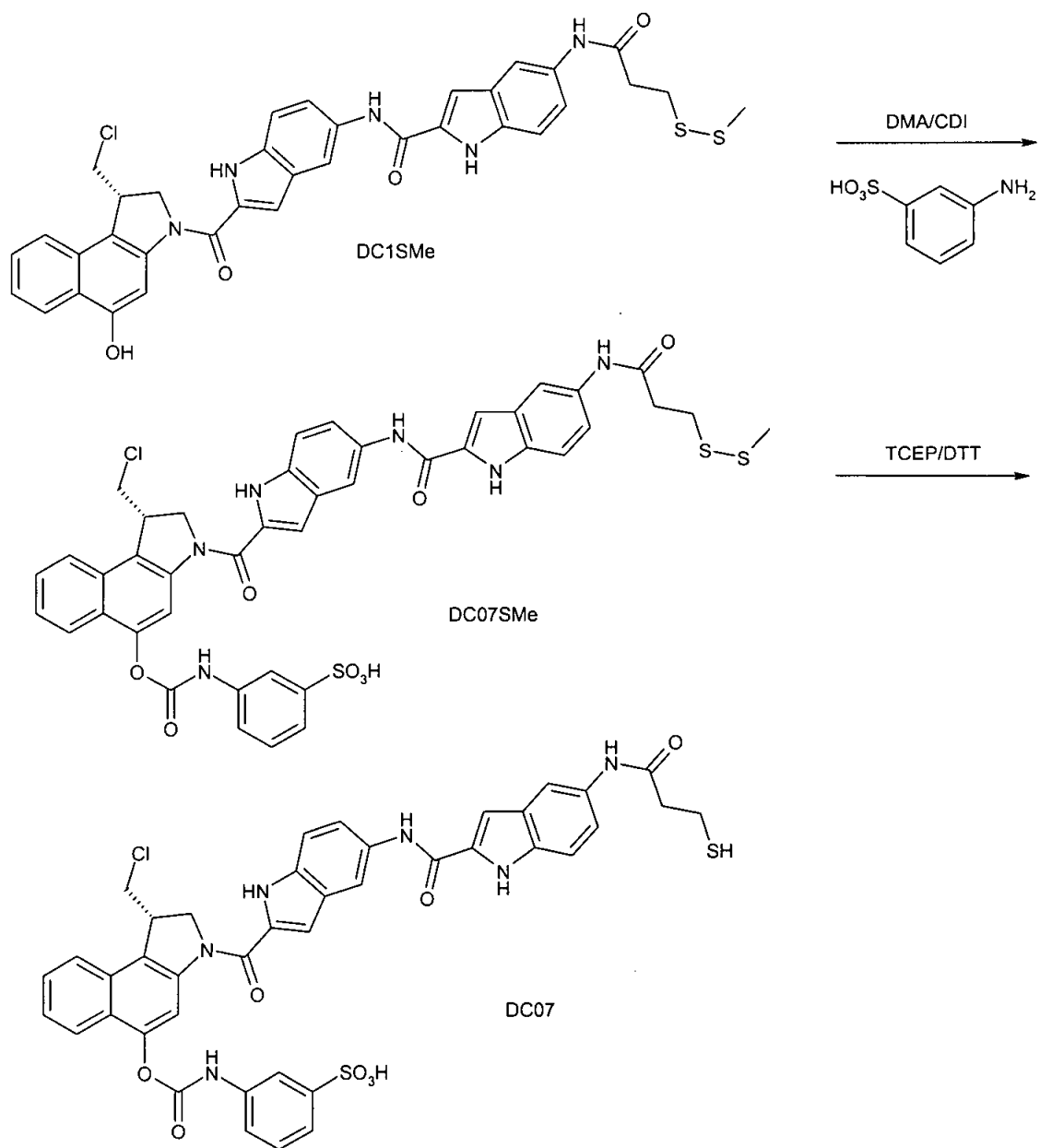
3/14

FIGURA 2



5/14

FIGURA 4A



7/14

FIGURA 4C

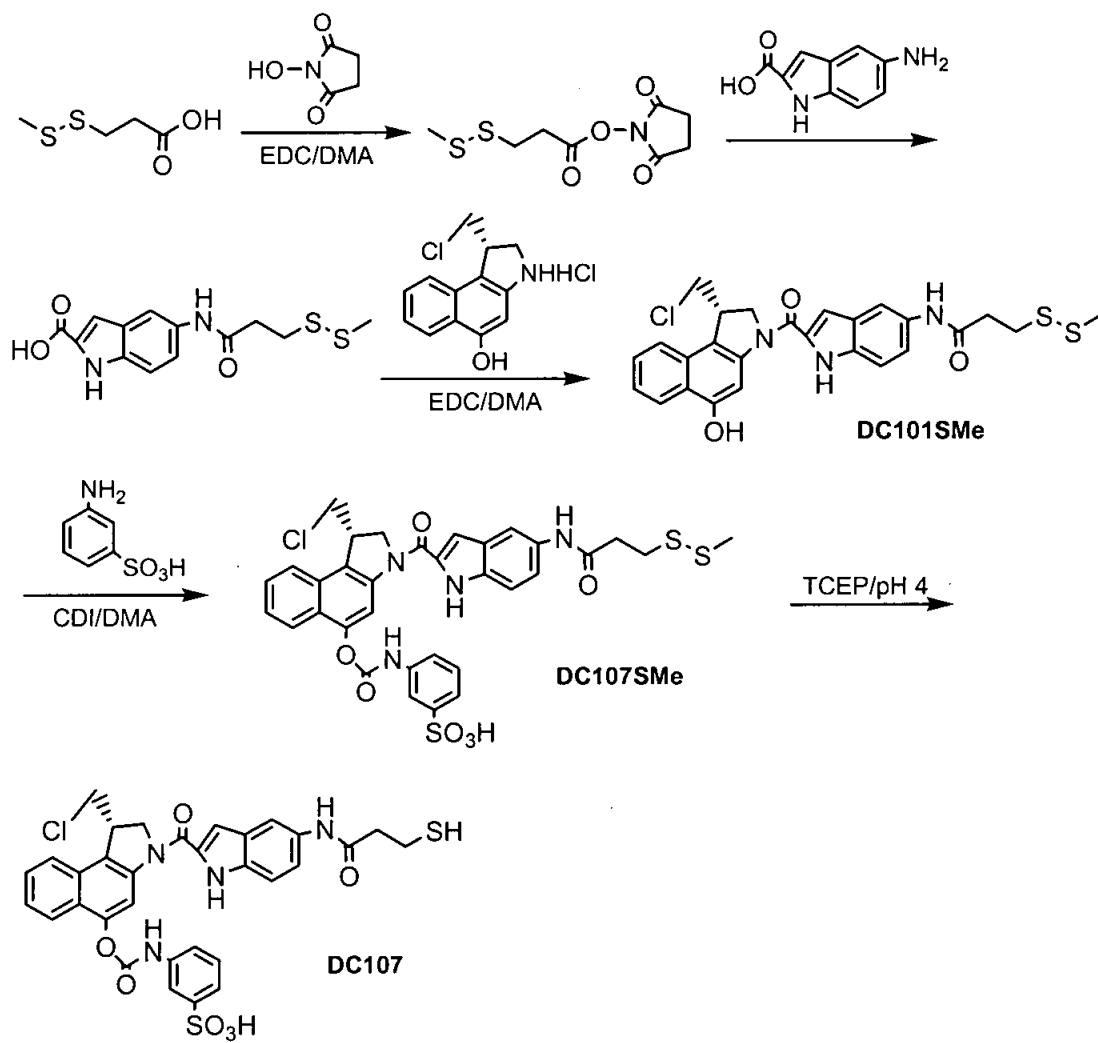
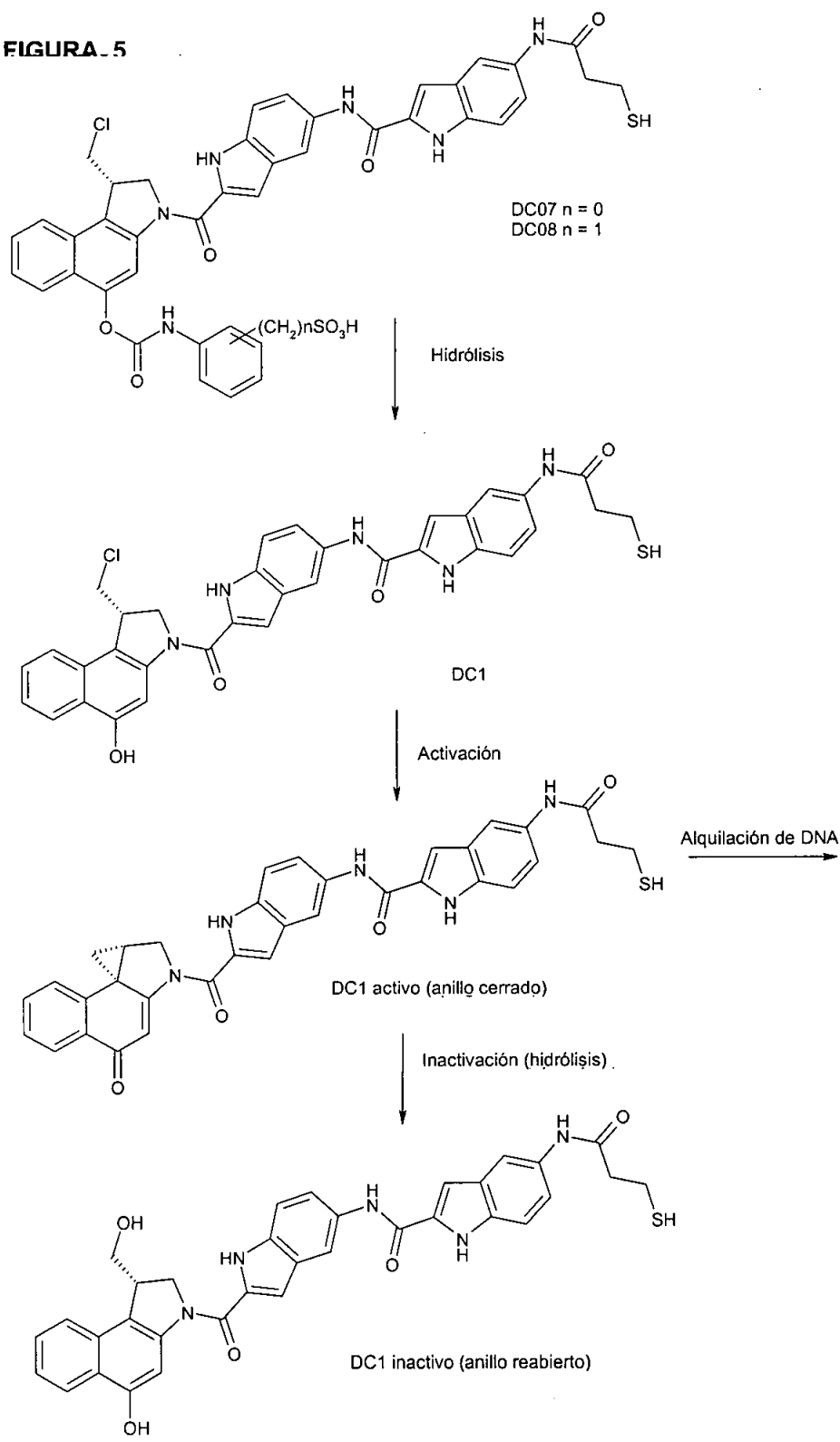
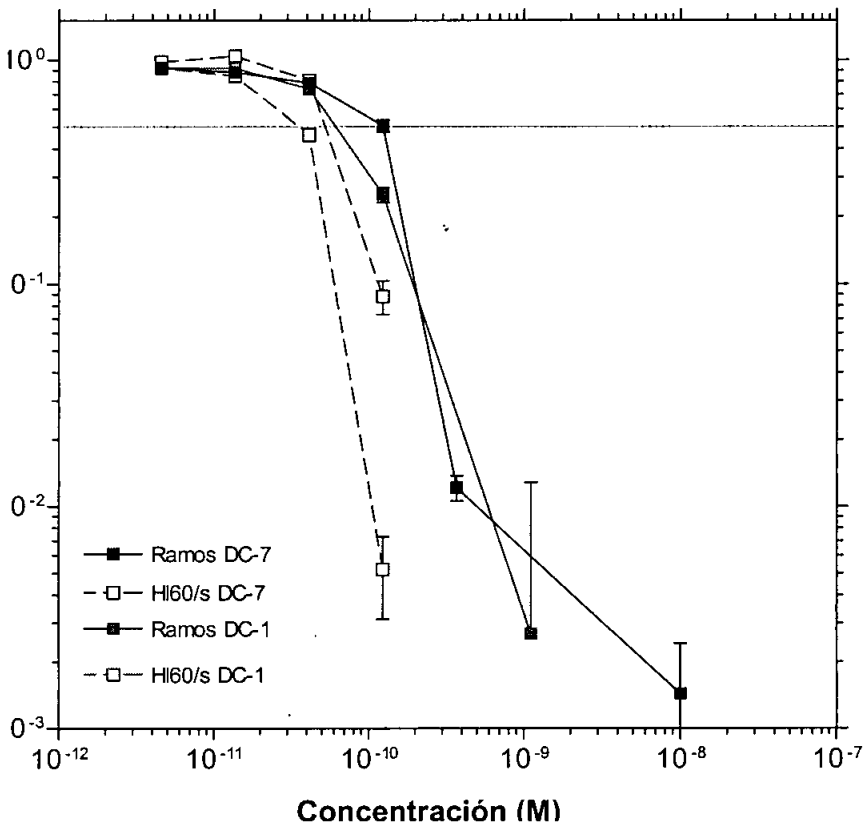


FIGURA 5



9/14

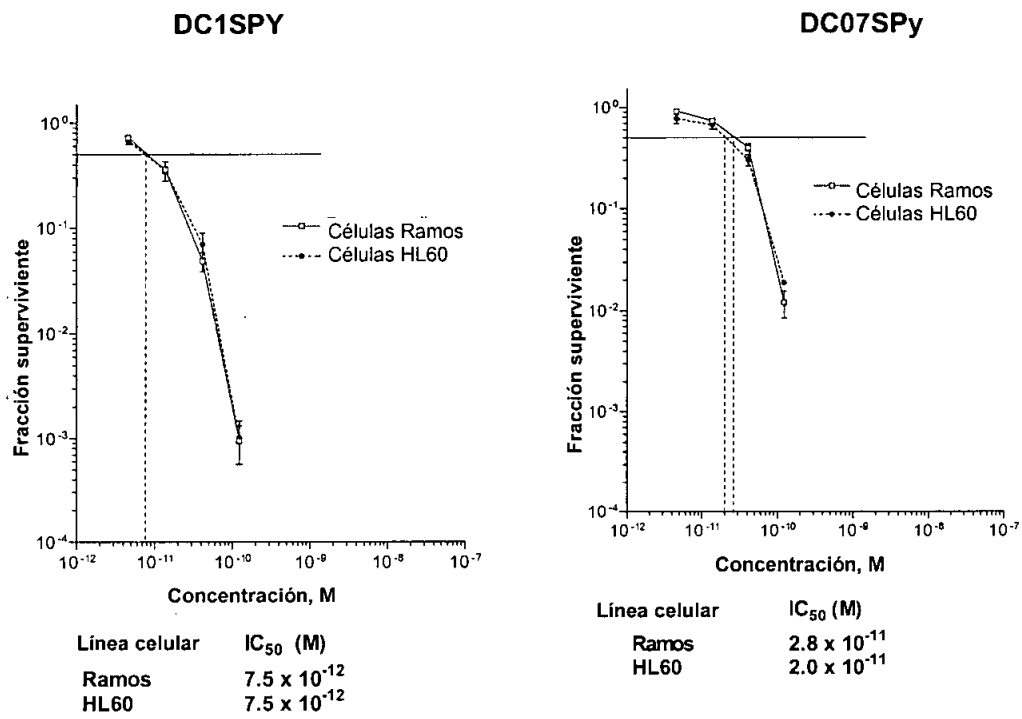
Figura 6



10/14

Figura 7

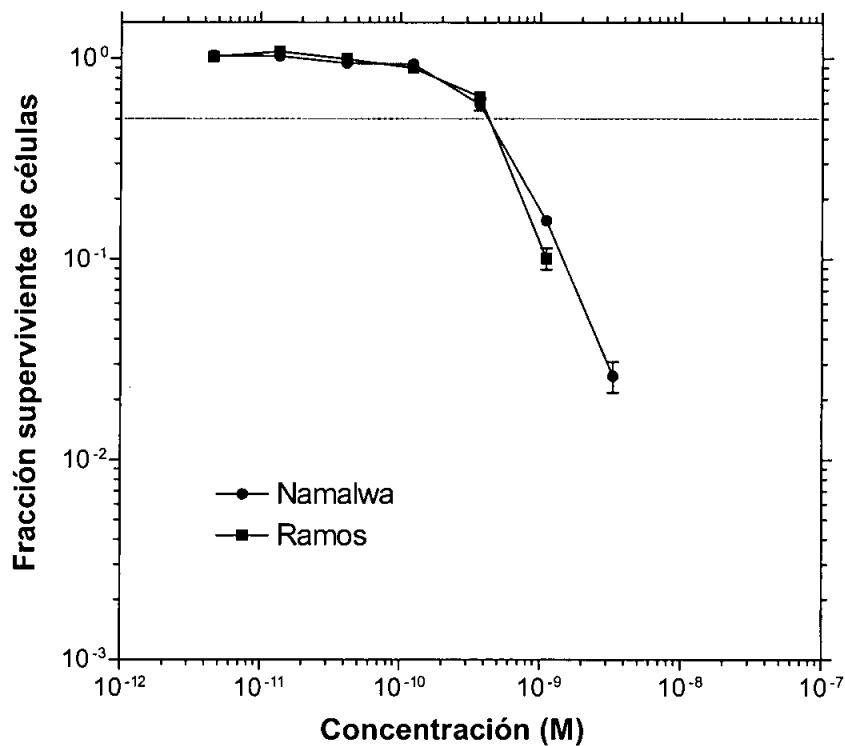
5



11/14

Figura 8

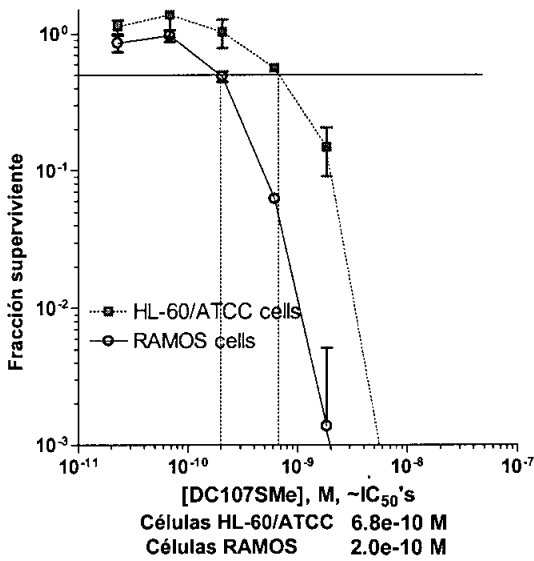
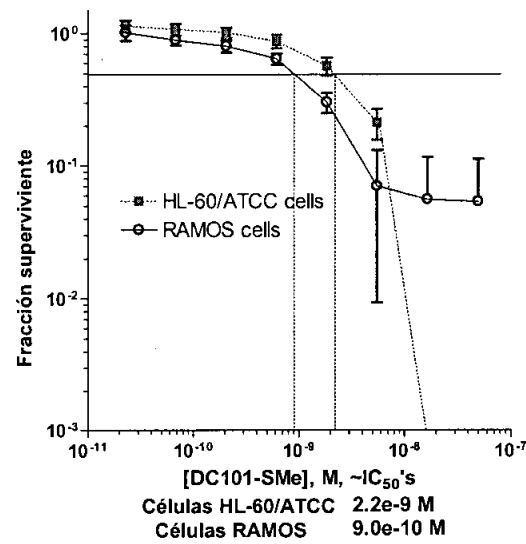
5



	IC50 values
Linea celular	DC08-SSpy
Ramos	$4.2 \times 10^{-10}M$
Namalwa	$4.2 \times 10^{-10}M$

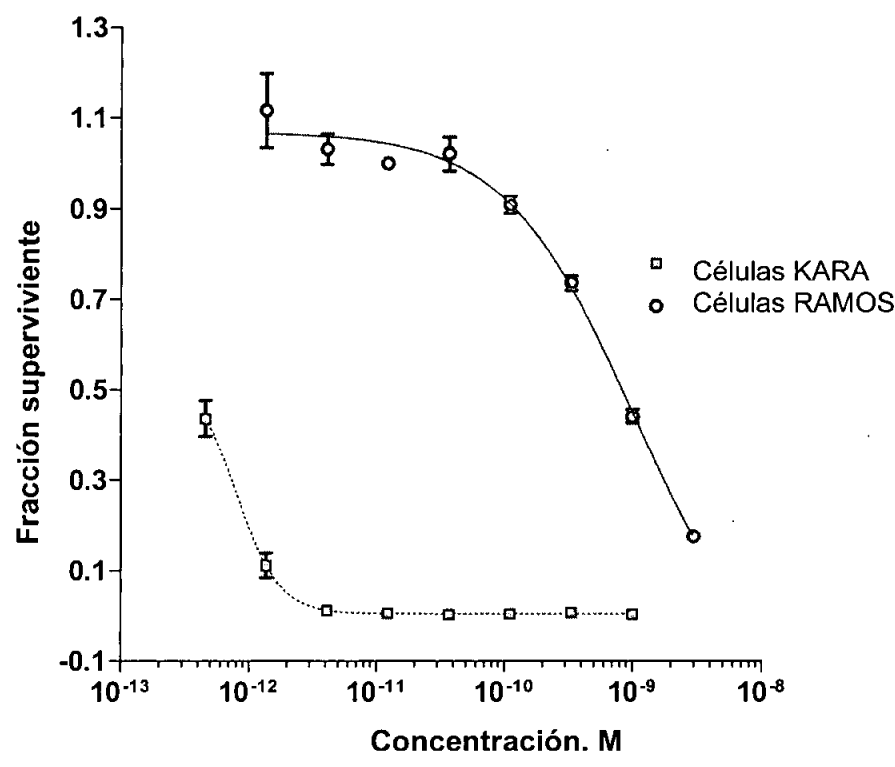
12/14

Figura 9:



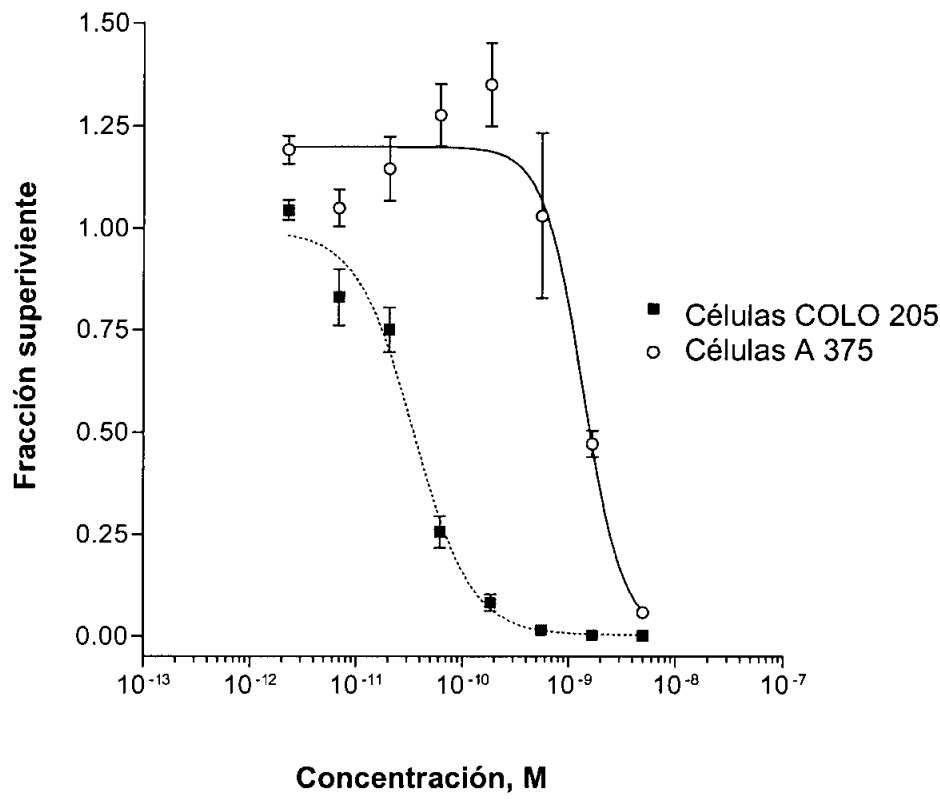
13/14

FIGURA 10



14/14

FIGURA 11



	IC ₅₀
COLO 205	3.50 x 10 ⁻¹¹ M
A 375	1.36 x 10 ⁻⁹ M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D209/60 C07D401/14 A61K31/404 A61K31/4439 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 756 397 B2 (ZHAO ROBERT YONGXIN ET AL) 29 June 2004 (2004-06-29) cited in the application the whole document	1-34
Y	EP 0 537 905 A (VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES, INC) 21 April 1993 (1993-04-21) examples 1-3,6 page 22, lines 48-54	1-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *8* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2007

Date of mailing of the international search report

12/07/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

MATES VALDIVIELSO, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/000521

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
US 6756397	B2	29-06-2004	AU	2003218062	A1	27-10-2003
			CA	2480759	A1	23-10-2003
			EP	1492526	A2	05-01-2005
			JP	2005532287	T	27-10-2005
			WO	03086318	A2	23-10-2003
			US	2003199519	A1	23-10-2003
			US	2004109867	A1	10-06-2004
EP 0537905	A	21-04-1993	AT	135002	T	15-03-1996
			CA	2080393	A1	16-04-1993
			CZ	9203122	A3	12-05-1993
			DE	69208802	D1	11-04-1996
			DE	69208802	T2	02-10-1996
			DK	537905	T3	22-07-1996
			ES	2086669	T3	01-07-1996
			FI	924678	A	16-04-1993
			GR	3020109	T3	31-08-1996
			NZ	244754	A	28-03-1995
			PL	296256	A1	18-10-1993
			PL	299303	A1	10-01-1994

148

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		NO de solicitud internacional PCT/IB2007/000521
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD INV. C07D209/60 C07D401/14 A61K31/404 A61K31/4439 A61P35/00 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de la clasificación) C07D A61K A61P Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones No.
Y	US 6 756 397 B2 (ZHAO ROBERT YONGXIN ET AL) 29 Junio 2004 (29-06-2004) citado en la solicitud el documento completo	1-34
Y	EP 0 537 905 A (VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES, INC) 21 Abril 1993 (21-04-1993) ejemplos 1-3, 6 página 22, líneas 48-54	1-34
9 En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos.		
• Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo.		
* Categorías especiales de los documentos citados:		
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)		
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada		
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención		
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado		
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.		
"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional		Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
5 Julio 2007		12/07/2007

149

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Nº de solicitud internacional
PCT/IB2007/000521

Nombre y dirección postal de la ISA Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HL Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado MATES VALDIVIESO, J
---	---

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familia de patentes

Nº de solicitud internacional

PCT/IB2007/000521

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 6756397	B2	29-06-2004	
		AU 2003218062 A1	27-10-2003
		CA 2480759 A1	23-10-2003
		EP 1492526 A2	05-01-2005
		JP 2005532287 T	27-10-2005
		WO 03086318 A2	23-10-2003
		US 2003199519 A1	23-10-2003
		US 2004109867 A1	10-06-2004
EP 0537905	A	21-04-1993	
		AT 135002 T	15-03-1996
		CA 2080393 A1	16-04-1993
		CZ 9203122 A3	12-05-1993
		DE 69208802 D1	11-04-1996
		DE 69208802 T2	02-10-1996
		DK 537905 T3	22-07-1996
		ES 2086669 T3	01-07-1996
		FI 924678 A	16-04-1993
		GR 3020109 T3	31-08-1996
		NZ 244754 A	28-03-1995
		PL 296256 A1	18-10-1993
		PL 299303 A1	10-01-1994

151

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MERLIER, Josiane
Sanofi Aventis
Département Brevets
174, Avenue de France
F-75013 Paris
FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 06 August 2008 (06.08.2008)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BET06P1288	
International application No. PCT/IB2007/000521	International filing date (day/month/year) 06 March 2007 (06.03.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:	
☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative	
Name and Address	State of Nationality State of Residence
	Telephone No.
	Facsimile No.
	E-mail address
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence	
Name and Address CHARI, Ravi 128 Sidney Street Cambridge, MA 02139 United States of America	State of Nationality State of Residence US US
	Telephone No.
	Facsimile No.
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 is now recorded as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.	
4. A copy of this notification has been sent to:	
☐ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Berrod Emmanuel e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +41 22 338 92 22
---	---

Facsimile No. +41 22 910 06 10

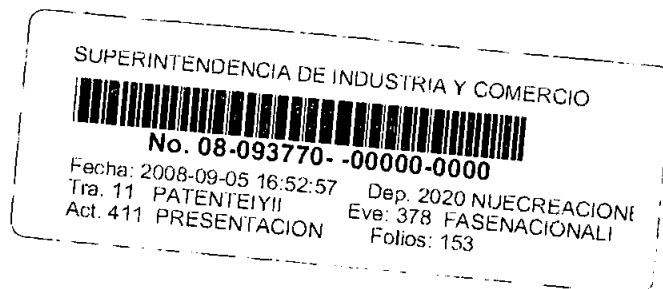
Form PCT/IB/306 (July 2008)

1/DQXN9PI30

153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2



RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 69,322
FECHA : SEPTIEMBRE 1 DE 2008

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	7438815	01/09/2008	50,610,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

010:14775-841-074-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-093770- -00000-0000

Fecha: 2008-09-05 16:52:57 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 153



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

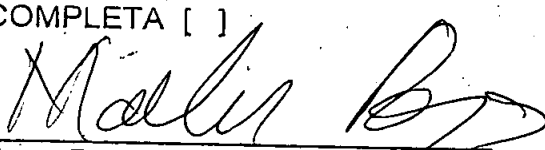
INCOMPLETA ☐

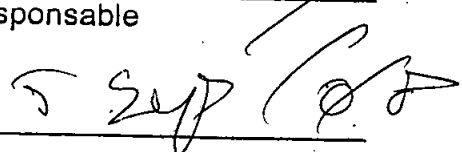
ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha 

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

155

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI AVENTIS

REFERENCIA	Radicación No.	8 93770
	Solicitud internacional	pct/ib2007/000521
	Fecha inicio fase nacional	07/10/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	12808

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 10 OCT. 2008
adpall