UN COMPUESTO DE ÁCIDO 3-((3-(((8-METOXI-6-OXO-11,12,12A, 13-TETRAHIDRO-6H-BENZO[5,6][1,4]DIAZEPINO[1,2-A]INDOL-9-IL)OXI)METIL)-5-(((8-METOXI-6-OXO-12A, 13-DIHIDRO-6H-BENZO [5,6][1,4] DIAZEPINO [1,2-] INDOL-9-YL)OXI)METIL)FENIL) AMINO) PÉPTIDO) ALQUILCARBOXÍLICO O UN DERIVADO DE ESTE

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación según 35 U.S.C. §119(e), de la solicitud provisional estadounidense N.° 62/045.248, presentada el 3 de septiembre de 2014, la solicitud provisional estadounidense N.° 62/087.040, presentada el 3 de diciembre de 2014, la solicitud provisional estadounidense N.° 62/149.370, presentada el 17 de abril de 2015 y la solicitud provisional estadounidense N.° 62/164.305, presentada el 20 de mayo de 2015, cuyos contenidos totales, incluso todos los dibujos, fórmulas, memorias descriptivas y reivindicaciones, se incorporan a la presente mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos citotóxicos novedosos y conjugados citotóxicos que comprenden estos compuestos citotóxicos y agentes de unión celular. Más

específicamente, la presente invención se refiere a compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos, intermedios de estos, conjugados de estos y sales farmacéuticamente aceptables de estos, los cuales son útiles como medicamentos, en particular como agentes antiproliferativos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los derivados de benzodiazepina son compuestos útiles para tratar diversos trastornos e incluyen medicamentos tales como antiepilépticos (imidazo [2,1-b][1,3,5]benzotiadiazepinas, patente estadounidense N.° 4.444.688; patente estadounidense N.° 4.062.852), antibacterianos (pirimido[1,2-c][1,3,5]benzotiadiazepinas, GB 1476684), diuréticos e hipotensores (pirrolo(1,2-b)[1,2,5]benzotiadiazepina 5,5 dióxido, patente estadounidense N.° 3.506.646), hipolipidémicos (WO 03091232), antidepresivos (patente estadounidense N.° 3.453.266); osteoporosis (JP 2138272).

Se ha demostrado en modelos de tumores animales que los derivados de benzodiazepina, por ejemplo pirrolobenzodiazepinas (PBD), actúan como agentes

antitumorales (1,2,5-benzotiadiazepina-1,1-dióxido sustituido con N-2-imidazolilalquilo, patente estadounidense N.° 6.156.746), benzo-pirido o dipirido tiadiazepina (WO 2004/069843), derivados de pirrolo [1,2-b] [1,2,5] benzotiadiazepinas y pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzodiazepina (WO2007/015280), derivados de tomaimicina (p. ej., pirrolo[1,4]benzodiazepinas), por ejemplo los descritos en WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930 y EP 2019104. También se conoce que las benzodiazepinas afectan el crecimiento celular y la diferenciación (Kamal A., *et al*., Bioorg Med Chem. 15 de agosto de 2008;16(16):7804-10 (y las referencias citadas allí); Kumar R, Mini Rev Med Chem. Junio de 2003; 3(4):323-39 (y las referencias citadas allí); Bednarski J J, *et al*., 2004; Sutter A. P, *et al*., 2002; Blatt N B, *et al*., 2002), Kamal A. *et al*., Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J.Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al*., Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. y Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465; y Tozuka, Z., *et al*., Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. La estructura general de las PBD se describe en el número de

publicación estadounidense 20070072846. Las PBD difieren en el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, en sus anillos A aromáticos y sus anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. Su capacidad para formar un aducto en el ADN de reticulación y surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN y, por lo tanto, su potencial de uso como agentes antiproliferativos.

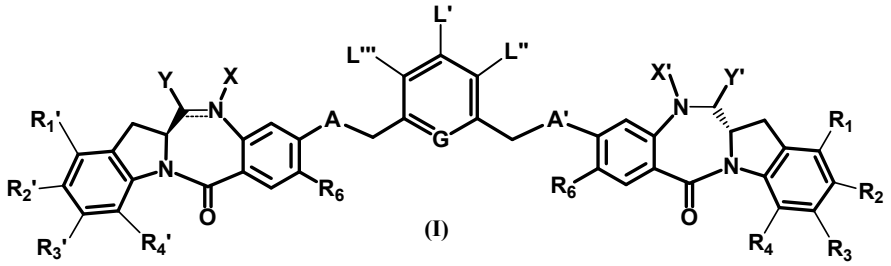
La primera pirrolobenzodiazepina en ingresar a la clínica, SJG-136 (NSC 694501) es un agente citotóxico potente que provoca reticulaciones entre cadenas de ADN (S.G Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *et al.*, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould *et al.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509). Los resultados de una evaluación clínica de fase I de SJG-136 reveló que este fármaco era tóxico en dosis extremadamente bajas (dosis máxima tolerada de 45 µg/m^2, y se observaron varios efectos adversos, incluso síndrome de fuga vascular, edema periférico, toxicidad en el hígado y fatiga. Se observó daño en el ADN en todas las dosis en los linfocitos

circulantes (D. Hochhauser *et al.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147). Por ende, existe la necesidad de derivados de benzodiazepina mejorados que sean menos tóxicos y aun así sigan siendo terapéuticamente activos para tratar diversos estados de enfermedad proliferativa, por ejemplo cáncer.

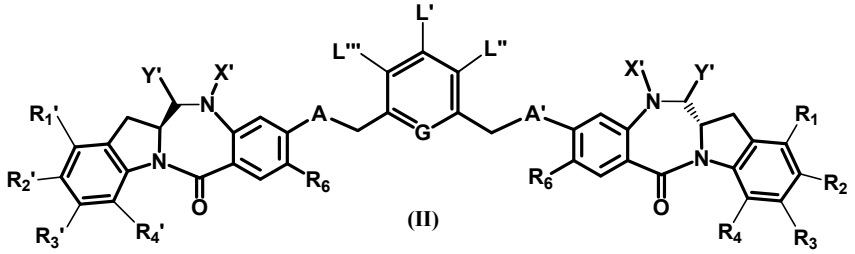
COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los compuestos de benzodiazepina novedosos descritos en la presente y los conjugados de estos tienen sorprendentemente alta potencia contra diversas células tumorales.

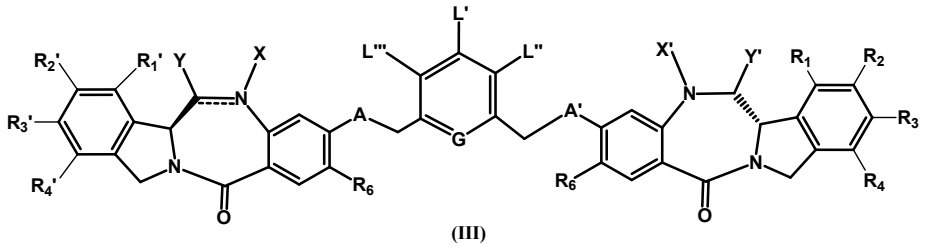
Un objeto de la invención es proporcionar un compuesto citotóxico representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:



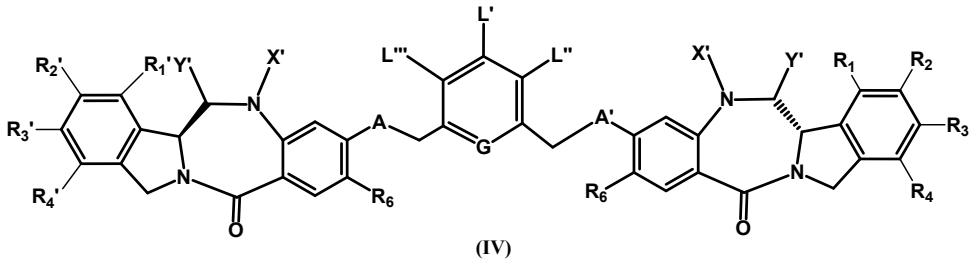
(I) ;



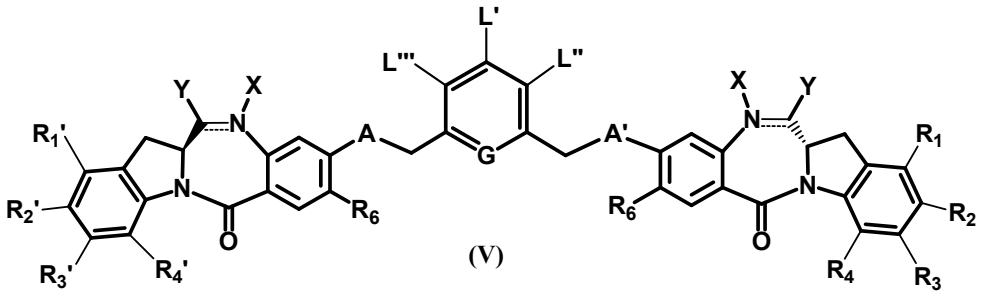
(II) ;



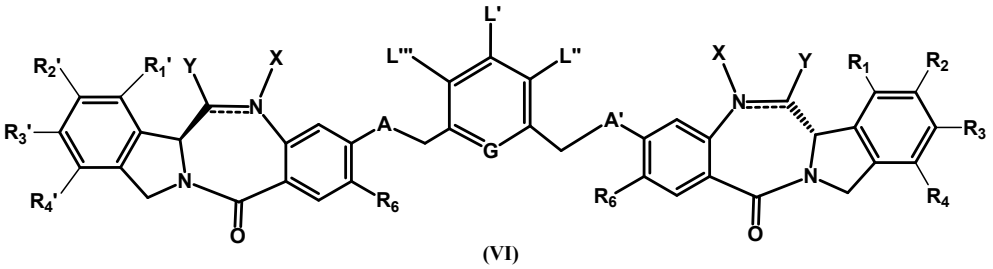
(III) ;



(IV) ;



(V) ○



(VI)

,

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

uno de L', L'' y L''' se representa por la siguiente fórmula:

$$-Z_1-P-Z_2-R_x-J \qquad (A)$$

y los otros dos son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH_2], -OR, -NR'R'', -NO_2, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO_2R', -SO_3H, -OSO_3H, -SO_2NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR' y -

OCONR'R'';

uno de Z_1 y Z_2 es –C(=O)- y el otro es –NR_5-;

P es un residuo de aminoácido o un péptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos;

R_x es un alquilo, alquenilo o alquinilo opcionalmente sustituido lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono;

J es un resto que comprende un grupo reactivo que es capaz de unirse por enlace covalente el compuesto citotóxico a un agente de unión celular;

la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es -H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y cuando es un enlace simple, X es –H o un resto protector amina;

Y es un grupo saliente seleccionado de -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido (p. ej., piperidina, tetrahidropirrol, pirazol, morfolina, etc., unido a través del átomo de nitrógeno), un guanidinio

representado por -NR'(C=NH)NR'R'', un residuo de aminoácido o un péptido representado por -NRCOP', -SR, -SOR', halógeno, ciano, azido, $-OSO_3H$, sulfito ($-SO_3H$ o $-SO_2H$), metabisulfito ($H_2S_2O_5$), mono, di, tri y tetratiofosfato (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2, PS_4H_2), éster de tiofosfato $(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS-, R^iSO, R^iSO_2, R^iSO_3, tiosulfato (HS_2O_3), ditionita (HS_2O_4), fosforoditioato ($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$), ácido hidroxámico ($R^{k'}C(=O)NOH$) y sulfoxilato de formaldehído ($HOCH_2SO_2^-$) o una mezcla de estos, en donde R^i es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y está sustituido con al menos un sustituyente seleccionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ y $-PO_3H$; R^i además puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ es un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo;

P' es un residuo de aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos,

R, para cada aparición, se selecciona independientemente del

grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, un arilo opcionalmente sustituido que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre o un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 heteroátomos seleccionados independientemente de O, S, N y P;

R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 6 heteroátomos seleccionados independientemente de O, S, N y P;

R^c es -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

n es un entero de 1 a 24;

X’ se selecciona de -H, un grupo protector amina, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, un arilo opcionalmente sustituido que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre y un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene de 1 a 6 heteroátomos seleccionados independientemente de O, S, N y P;

Y’ se selecciona de -H, un grupo oxo, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo de 6 a 18 miembros opcionalmente sustituido, un anillo heteroarilo de 5 a 18 miembros opcionalmente sustituido que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, un anillo heterocíclico de 3 a 18 miembros opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 6

heteroátomos;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, halógeno, guanidinio [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', $-NO_2$, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', $-SO_2R'$, $-SO_3^-H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, ciano, un azido, -COR', -OCOR' y -OCONR'R'';

R_6 es -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', $-NO_2$ o halógeno;

G es –CH- o –N-;

A y A' son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-NR_5$ y $-CRR'N(R_5)-$; y

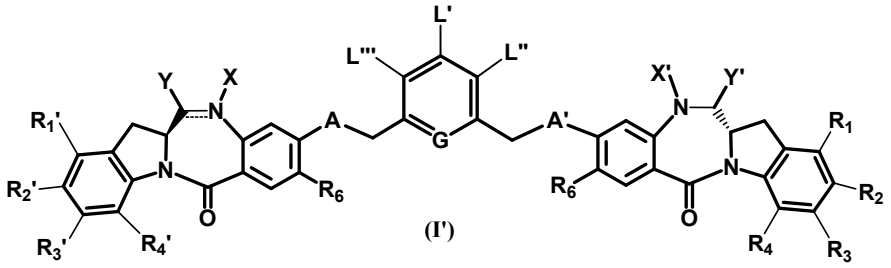
R_5 para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

En una modalidad, para los compuestos de fórmulas estructurales (I)-(VI), G es –CH-.

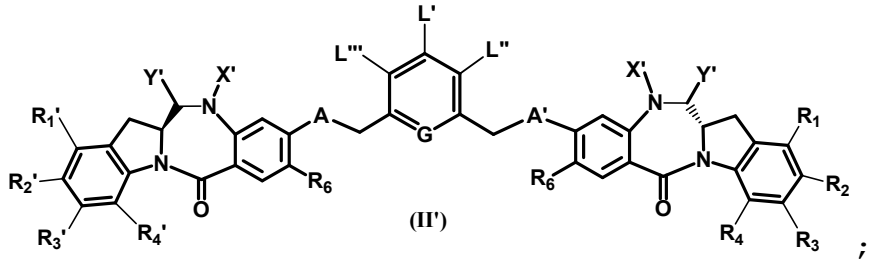
Un segundo objetivo de la invención es proporcionar conjugados

de agentes de unión celular con los compuestos de benzodiazepina novedosos o derivados de estos de la presente invención. Estos conjugados son útiles como agentes terapéuticos, los cuales se administran específicamente a células diana y son citotóxicos.

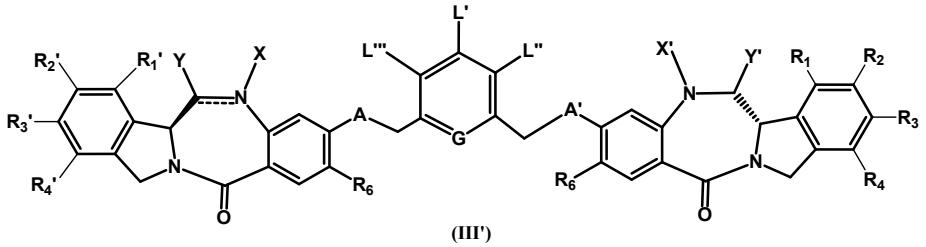
Específicamente, un conjugado de la invención puede comprender: un compuesto citotóxico y un agente de unión celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico está unidos de forma covalente al CBA, y en donde dicho compuesto citotóxico está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:



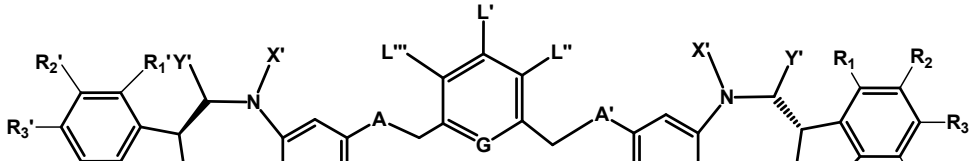
(I') ;

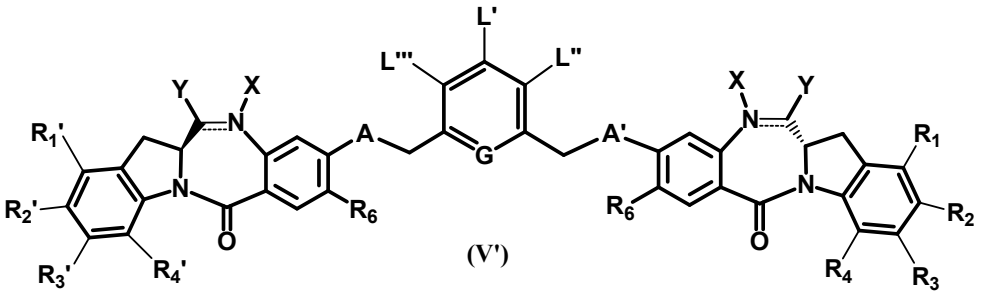


(II') ;



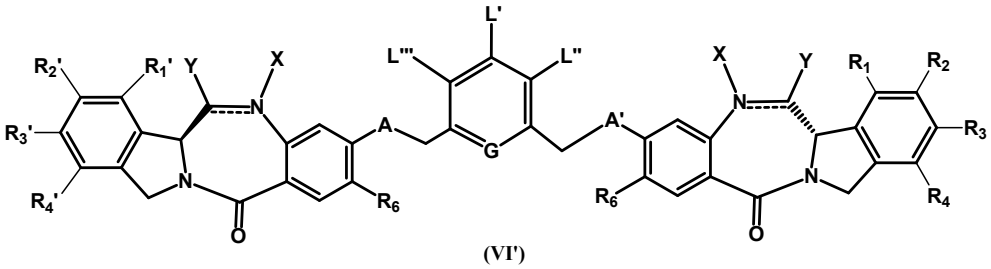
(III') ;





(V')

o



(VI')

,

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

uno de L′, L′′ y L′′′ se representa por la siguiente fórmula:

$$-Z_1-P-Z_2-R_x-J' \qquad (A')$$

y los otros dos son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de -H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, halógeno, guanidinio [$-NH(C{=}NH)NH_2$], -OR, -NR′R′′, $-NO_2$, -NR′COR′′, -SR, un sulfóxido representado por -SOR′, una sulfona representada por $-SO_2R'$,

un sulfonato $-SO_3M$, un sulfato $-OSO_3M$, una sulfonamida representada por $-SO_2NR'R''$, ciano, un azido, -COR', -OCOR' y -OCONR'R'';

J' es un resto que comprende un grupo enlazador que está unido por enlace covalente al agente de unión celular; y

el resto de las variables son como se describió anteriormente para las fórmulas (I)-(VI).

En una modalidad, para los conjugados de fórmulas estructurales (I)-(VI), G es –CH-.

En otra modalidad, para los conjugados de fórmulas estructurales (I')-(VI'), el agente de unión celular es un anticuerpo del receptor anti-folato o un fragmento de anticuerpo de este. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es anticuerpo huMOV19.

En aun otra modalidad, para los conjugados de fórmulas estructurales (I')-(VI'), el agente de unión celular es un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592, que se incorpora a la presente mediante

referencia. En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

La presente invención también incluye una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende los compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable). La presente invención incluye adicionalmente una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende los compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable) que además comprende un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano). Las presentes composiciones son útiles para tratar afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, inmunodeficiencia tal

como SIDA, y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., ser humano).

La presente invención incluye un método para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano) que comprende administrarle a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos y sales de estos) o una composición de estos, solos o combinados con un segundo agente terapéutico.

La presente invención incluye un método para sintetizar y utilizar compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos y conjugados de estos para el diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamíferos, organismos o afecciones patológicas asociadas.

Los compuestos de la presente invención, derivados de estos o conjugados de estos, y las composiciones que los comprenden, son útiles para tratar o disminuir la gravedad de trastornos, por ejemplo, caracterizados por crecimiento anormal de células (p. ej., cáncer). Otras aplicaciones para los compuestos y

conjugados de la presente invención incluyen, entre otros, tratar afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, inmunodeficiencia tal como SIDA y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., ser humano).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra afinidad de unión del conjugado **huMOV19-14** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.

La figura 2 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huMOV19-14**.

La figura 3 muestra que el conjugado **huMOV19-14** presenta efecto citotóxico testigo débil en las células negativas al antígeno vecinas.

Las figuras 4A, 4B y 4C muestran citotoxicidad *in vitro* del conjugado **huMy9-6-14** contra diversas líneas celulares.

Las figuras 5A y 5B muestran que el conjugado **huMy9-6-14** presenta efecto citotóxico testigo en las células negativas al

antígeno vecinas.

La figura 6 muestra eficacia *in vivo* de los conjugados **huMOV19-80** y **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan NCI-H2110.

Las figuras 7A-7D muestran perfiles de espectrometría de masas de conjugados representativos de la presente invención.

La figura 8 muestra perfil de espectrometría de masas del conjugado **huML66-90.**

La figura 9 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huML66-90.**

Las figuras 10, 11 y 12 muestran citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huMOV19-90.**

La figura 13 muestra que el conjugado huMOV19-90 presenta efecto citotóxico testigo fuerte en las células negativas al antígeno vecinas.

La figura 14 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan NCI-H2110.

Las figuras 15A y 15B muestran afinidad de unión del conjugado **huMOV19-90** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.

La figura 16 muestra perfiles de espectrometría de masas de un

conjugado representativo de la presente invención.

La figura 17 muestra eficacia in vivo del conjugado **huML66-90** en ratones SCID que presentan NCI-H1703 NSCLC.

La figura 18 muestra farmacocinética de **huMOV19-90** en ratones CD-1.

Las figuras 19A y 19B muestran la estructura del conjugado **huMOV19-90** (figura 19A) y un esquema para la incubación, purificación e aislamiento de catabolitos del conjugado **huMOV19-90** formado en células de cáncer de cuello uterino KB *in vitro* (figura 19B). Los tres catabolitos identificados por LC-MS se muestran junto con la masa calculada.

La figura 20 muestra afinidad de unión del conjugado **huMOV19-107** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.

La figura 21 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad de los conjugados **huMOV19-90** y **huMOV19-107.**

La figura 22 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presenta xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC.

La figura 23 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan xenoinjertos endometriales Hec-

1b.

La figura 24 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan xenoinjertos endometriales Ishikawa.

La figura 25 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-107** en ratones SCID que presenta xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC.

La figura 26 muestra afinidad de unión del conjugado **huCD123-6Gv4.7S3-90** en comparación con el anticuerpo no conjugado en células HNT-34.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A continuación se hará referencia de forma detallada a determinadas modalidades de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Si bien la invención se describirá junto con las modalidades enumeradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a tales modalidades. Por el contrario, se pretende que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Un experto

en la técnica reconocerá varios métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, los cuales podrían utilizarse en la práctica de la presente invención.

Se debe entender que cualquiera de las modalidades descritas en la presente, incluido aquellas descritas bajo diferentes aspectos de la invención (p. ej., compuestos, moléculas enlazadoras de compuestos, conjugados, composiciones, métodos de preparar y utilizar) y diferentes partes de la memoria descriptiva (incluido las modalidades descritas solo en los ejemplos) se pueden combinar con una o más modalidades diferentes de la invención, a menos que se niegue explícitamente o sea inadecuado. La combinación de modalidades no se limita a las combinaciones específicas reivindicadas mediante las múltiples reivindicaciones dependientes.

DEFINICIONES

Según se emplea en la presente, el término "**agente de unión celular**" o "**CBA**" se refiere a un compuesto que se puede unir a una célula (p. ej., en un ligando de superficie celular) o unir a un ligando asociado con la célula o próximo a esta,

preferentemente de un modo específico. En determinadas modalidades, la unión a la célula o a un ligando en la célula o cerca de esta es específica. El CBA puede incluir péptidos y no péptidos.

"Alquilo lineal o ramificado", según se emplea en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a veinte átomos de carbono. Algunos ejemplos de alquilo incluyen, entre otros, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, -$CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo), 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo, 1-octilo y similares. Preferentemente, el alquilo tiene de uno a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

"Alquenilo lineal o ramificado" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos

a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un carbono-carbono, doble enlace, en donde el radical alquenilo incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Algunos ejemplos incluyen, entre otros, etilenilo o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$) y similares. Preferentemente, el alquenilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

"**Alquinilo lineal o ramificado**" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple carbono-carbono. Algunos ejemplos incluyen, entre otros, etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo y similares. Preferentemente, el alquinilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquinilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

Los términos "**carbociclo**", "**carbocíclico**" y "**anillo carbocíclico**" se refieren a un anillo saturado o parcialmente

insaturado, no aromático, monovalente que tiene de 3 a 12 átomos de carbono como un anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como un anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos del anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6] o como sistemas puenteados como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Algunos ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares.

Los términos "**alquilo cíclico**" y "**cicloalquilo**" se pueden utilizar indistintamente. Se refieren a un radical de anillo carbocíclico saturado monovalente. Preferentemente, el alquilo cíclico es un radical de anillo monocíclico de 3 a 7 miembros. Más preferentemente, el alquilo cíclico es ciclohexilo.

El término "**alquenilo cíclico**" se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace doble en la estructura del anillo.

El término "**alquinilo cíclico**" se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace triple en la estructura del anillo.

"**Arilo**" significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos aromáticos parental. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como "Ar". El arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado con un anillo saturado o parcialmente insaturado o un anillo heterocíclico o carbocíclico aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, entre otros, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Preferentemente, arilo es un grupo fenilo.

Los términos **"heterociclo"**, **"heterociclilo"** y **"anillo**

heterocíclico" se utilizan de forma indistinta en la presente y hacen referencia a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a 18 átomos en el anillo, donde al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y los átomos del anillo restantes son C, en donde uno o más átomos del anillo están opcionalmente sustituidos de forma independiente con uno o más sustituyentes que se describen a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en

particular volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. **"Heterociclilo"** también incluye radicales donde los radicales heterociclo se encuentran fusionados con un anillo carbocíclico o heterocíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, de modo no taxativo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidinilo, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidiniloimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabiciclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabiciclo[4.1.0]heptanilo y azabiciclo[2.2.2]hexanilo. Los restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Algunos ejemplos de un grupo heterocíclico en donde se sustituyen

átomos del anillo con restos de oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo.

El término **"heteroarilo"** se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5 o 6 miembros e incluye sistemas de anillos fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-18 átomos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Algunos ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluido, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluido, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizinilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden ser carbono (unido a carbono) o nitrógeno (unido a nitrógeno) unidos donde sea posible. A modo de ejemplo y sin limitación, los heteroarilos o heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de un azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo y sin limitación, los heteroarilos o heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrolo, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4

de una morfolina y posición 9 de un carbazol u O-carbolina.

Los heteroátomos presentes en heteroarilo o heterociclilo incluyen formas oxidadas como NO, SO y SO_2.

El término "**halo**" o "**halógeno**" se refiere a F, Cl, Br o I.

El alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo cíclico, alquenilo cíclico, alquinilo cíclico, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo descritos arriba pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes.

Si un sustituyente se describe como "**sustituido**", un sustituyente no hidrógeno se encuentra en lugar de un sustituyente hidrógeno en un carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno del sustituyente. Por lo tanto, por ejemplo, un sustituyente alquilo sustituido es un sustituyente alquilo en donde al menos un sustituyente no hidrógeno se encuentra en lugar de un sustituyente hidrógeno en el sustituyente alquilo. A modo de ilustración, el monofluoroalquilo es alquilo sustituido con un sustituyente fluoro y difluoroalquilo es alquilo sustituido con dos sustituyentes fluoro. Se debe reconocer que si hay más de una sustitución en un sustituyente,

cada sustituyente no hidrógeno puede ser idéntico o diferente (a menos que se indique algo diferente).

Si un sustituyente se describe como **"opcionalmente sustituido"**, el sustituyente puede estar o bien (1) no sustituido o (2) sustituido. Si un carbono de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el carbono (en caso de que haya) se pueden reemplazar por separado y/o junto con un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Si un nitrógeno de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el nitrógeno (en caso de que haya) se pueden reemplazar cada uno con un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Un sustituyente ejemplar se puede describir como -NR'R'', en donde R' y R'' junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden formar un anillo heterocíclico. El anillo heterocíclico formado a partir de R' y R'', junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden estar parcial o totalmente saturados. En una modalidad, el anillo heterocíclico consiste

en 3 a 7 átomos. En otra modalidad, el anillo heterocíclico se selecciona del grupo que consiste en pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, piridilo y tiazolilo.

La presente memoria descriptiva emplea los términos "**sustituyente**", "**radical**" y "**grupo**" indistintamente.

Si un grupo de sustituyentes se describen colectivamente como opcionalmente sustituidos por uno o más de una lista de sustituyentes, el grupo puede incluir: (1) sustituyentes no sustituibles, (2) sustituyentes sustituibles que no están sustituidos por los sustituyentes opcionales y/o (3) sustituyentes sustituibles que están sustituidos por uno o más de los sustituyentes opcionales.

Si un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con hasta una cantidad específica de sustituyentes no hidrógeno, dicho sustituyente puede estar (1) no sustituido; o (2) sustituido por hasta esa cantidad particular de sustituyentes no hidrógeno o por hasta la cantidad máxima de posiciones sustituibles en el sustituyente, lo que sea inferior. Por ende, por ejemplo, si un sustituyente se describe

como un heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes no hidrógeno, entonces cualquier heteroarilo con menos de 3 posiciones sustituibles estaría opcionalmente sustituido por hasta solamente tantos sustituyentes no hidrógeno como las posiciones sustituibles que tenga el heteroarilo. Dichos sustituyentes, en los ejemplos no taxativos, se pueden seleccionar de un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tenga de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, guanidinio [$-NH(C=NH)NH_2$], $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, un sulfóxido representado por $-SOR^{101}$, una sulfona representada por $-SO_2R^{101}$, un sulfonato $-SO_3M$, un sulfato $-OSO_3M$, una sulfonamida representada por $-SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, un azido, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ y una unidad de polietilenglicol $(-CH_2CH_2O)_nR^{101}$ en donde M es H o un catión (como Na^+ o K^+); R^{101}, R^{102} y R^{103} se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-CH_2CH_2O)_n-R^{104}$, en donde n es un entero de 1 a 24, un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de

carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono y un heteroarilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono; y R^{104} es H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, en donde el alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo en los grupos representados por R^{100}, R^{101}, R^{102}, R^{103} y R^{104} están opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, -OH, -CN, $-NO_2$ y alquilo lineal o ramificado insustituido que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, los sustituyentes para el alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo cíclico, alquenilo cíclico, alquinilo cíclico, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo opcionalmente sustituido descritos arriba incluyen halógeno, -CN, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, arilo, heteroarilo, heterociclilo, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ y $-SO_3M$.

Los términos "**compuesto**" o "**compuesto citotóxico**", "**dímero citotóxico**" y "**compuesto de dímero citotóxico**" se utilizan indistintamente. Incluyen los compuestos para los cuales se ha descrito una estructura o fórmula, o cualquier derivado de estos, en la presente invención o se ha incorporado una

estructura o fórmula, o cualquier derivado de estos, mediante referencia. El término también incluye, estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, solvatos, metabolitos, sales (p. ej., sales farmacéuticamente aceptables) y profármacos y sales de profármacos de un compuesto de todas las fórmulas descritas en la presente invención. El término también incluye cualquier solvato, hidrato y polimorfo de cualquiera de los anteriores. La mención específica de "estereoisómeros", "isómeros geométricos", "tautómeros", "solvatos", "metabolitos", "sal", "profármaco", "sal de profármaco", "conjugados", "sal de conjugados", "solvato", "hidrato" o "polimorfo" en determinados aspectos de la invención descrita en la presente solicitud no se debe interpretar como una omisión intencionada de estas formas en otros aspectos de la invención en donde el término "compuesto" se utiliza sin mención de estas otras formas.

El término "**conjugado**", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto descrito en la presente o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión celular.

El término "**que se puede unir a un agente de unión celular**",

según se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos descritos en la presente, o derivados de estos, que comprenden al menos un grupo de unión o un precursor de este adecuado para unir estos compuestos o derivados de estos a un agente de unión celular.

El término "**precursor**" de un grupo determinado se refiere a cualquier grupo que puede dar lugar a dicho grupo mediante cualquier desprotección, una modificación química o una reacción de acoplamiento.

El término "**unido a un agente de unión celular**" se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos uno de los compuestos descritos en la presente (p. ej., compuestos de fórmula (I)-(IV) y (VIII)-(XI) y compuestos de fármaco-enlazador descritos en la presente), o un derivado de estos, unido a un agente de unión celular a través de un grupo de unión adecuado o un precursor de este.

El término "**quiral**" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de imposibilidad de superposición de imágenes especulares, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles con sus imágenes especulares.

El término "**estereoisómero**" se refiere a compuestos que tienen constitución química y conectividad idénticas, pero diferentes orientaciones de sus átomos en el espacio que no se puede interconvertir por rotación alrededor de enlaces simples.

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

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

Las convenciones y definiciones estereoquímicas que se utilizan en la presente siguen, en líneas generales, lo planteado por S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y por Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención

pueden contener centros quirales o asimétricos y, por lo tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que formen parte de la presente invención todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, los que incluyen de modo no taxativo diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de estos, tales como mezclas racémicas. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de desviar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o *R* y *S* se utilizan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de luz polarizada plana por el compuesto, donde (-) o 1 significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo *(+)* o *d* es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo que son imágenes especulares uno del otro. También se puede hacer referencia a un estereoisómero específico como un enantiómero y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica.

Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede ocurrir donde no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

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

El término “**profármaco**”, según se emplea en la presente solicitud, se refiere a un precursor o una forma derivada de un compuesto de la invención que es capaz de activarse de forma enzimática o hidrolítica o convertirse en la forma parental más activa. Véase, p. ej., Wilman, “Prodrugs in Cancer

Chemotherapy," Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615° Meeting Belfast (1986) y Stella *et al*., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al*., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, entre otros, profármacos que contienen ésteres, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfatos, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por aminoácido D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Algunos ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivar en una forma de profármaco para utilizar en la presente invención incluyen, entre otros, compuestos de la invención y agentes quimioterapéuticos como los descritos arriba.

El término "**profármaco**" también incluye un derivado de un

compuesto que se puede hidrolizar, oxidar o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto de la presente invención. Los profármacos solo se pueden volver activos tras dicha reacción en condiciones biológicas o pueden tener actividad en sus formas sin reaccionar. Algunos ejemplos de profármacos contemplados en la presente invención incluyen, entre otros, análogos o derivados de compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden restos biohidrolizables como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. Otros ejemplos de profármacos incluyen derivados de compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden restos –NO, $-NO_2$, –ONO o $-ONO_2$. Los profármacos se pueden preparar típicamente utilizando métodos conocidos, como los descritos por Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5° ed.); véase también Goodman y Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8° ed.,

McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

Una forma preferida de profármaco de la invención incluye compuestos (con o sin grupos de unión) y conjugados de la invención que comprenden un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos/conjugados y un reactivo de reacción imina. Otra forma preferida de profármaco de la invención incluye compuestos como aquellos de fórmula (I) - (IV), en donde cuando la línea doble = entre N y C representa un enlace simple, X es H o un grupo protector amina y el compuesto se convierte en un profármaco. Un profármaco de la invención puede contener una o ambas formas de profármacos descritas en la presente (p. ej., las que contienen un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos/conjugados y un reactivo de reacción imina y/o las que contienen un grupo saliente Y cuando X es -H).

El término "**reactivo de reacción imina**" se refiere a un reactivo que es capaz de reaccionar con un grupo imina. Algunos ejemplos de reactivos de reacción imina incluyen, entre otros, sulfitos (H_2SO_3, H_2SO_2 o una sal de HSO_3^-, SO_3^{2-} o HSO_2^- formada con un catión), metabisulfito ($H_2S_2O_5$ o una sal de $S_2O_5^{2-}$ formada

con un catión), mono, di, tri y tetratiofosfatos (PO_3SH_3, $PO_2S_2H_3$, POS_3H_3, PS_4H_3 o una sal de PO_3S^{3-}, $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} o PS_4^{3-} formada con un catión), ésteres de tiofosfato ($(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iSH, R^iSOH, R^iSO_2H, R^iSO_3H), diversas aminas (hidroxilamina (p. ej., NH_2OH), hidrazina (p. ej., NH_2NH_2), NH_2O-R^i, $R^{i\prime}NH-R^i$, NH_2-R^i), $NH_2-CO-NH_2$, $NH_2-C(=S)-NH_2$, tiosulfato ($H_2S_2O_3$ o una sal de $S_2O_3^{2-}$ formada con un catión), ditionita ($H_2S_2O_4$ o una sal de $S_2O_4^{2-}$ formada con un catión), fosforoditioato ($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ o una sal de este formada con un catión), ácido hidroxámico ($R^kC(=O)NHOH$ o una sal formada con un catión), hidrazida ($R^kCONHNH_2$), sulfoxilato de formaldehído ($HOCH_2SO_2H$ o una sal de $HOCH_2SO_2^-$ formada con un catión, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$), nucleótido glicado (como GDP-manosa), fludarabina o una mezcla de estos, en donde R^i y $R^{i\prime}$ son cada uno independiente un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y están sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$ y $-PO_3H$; R^i y $R^{i\prime}$ además pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^j es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de

carbono; y R^k es un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo (preferentemente, R^k es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono; más preferentemente, R^k es metilo, etilo o propilo). Preferentemente, el catión es un catión monovalente, como Na^+ o K^+. Preferentemente, el reactivo de reacción imina se selecciona de sulfitos, hidroxilamina, urea e hidrazina. Más preferentemente, el reactivo de reacción imina es $NaHSO_3$ o $KHSO_3$.

Según se utiliza en la presente y a menos que se indique algo diferente, los términos "**amida biohidrolizable**", "**éster biohidrolizable**", "**carbamato biohidrolizable**", "**carbonato biohidrolizable**", "**ureido biohidrolizable**" y "**análogo de fosfato biohidrolizable**" significan una amida, éster, carbamato, carbonato, ureido o análogo de fosfato, respectivamente, que o bien: 1) no destruye la actividad biológica del compuesto y le confiere al compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, como absorción, duración de la acción o inicio de la acción; o 2) es en sí mismo biológicamente

inactivo, pero se convierte *in vivo* en un compuesto biológicamente activo. Algunos ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, entre otras, amidas de alquilo inferior, amidas de α-aminoácido, amidas de alcoxiacilo y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo. Algunos ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, entre otros, ésteres de alquilo inferior, ésteres de alcoxiaciloxi, ésteres de alquilo acilamino alquilo y ésteres de colina. Algunos ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, entre otros, alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas y aminas de poliéter. Los profármacos favorecidos particularmente y las sales de profármaco son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando dichos compuestos se administran a un mamífero.

La frase **"sal farmacéuticamente aceptable"**, tal como se emplea en la presente, hace referencia a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Algunas sales ejemplares incluyen, entre otras, las sales

sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metansulfonato "mesilato", etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (p. ej., de sodio y de potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio) y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Las instancias en que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden presentar múltiples contraiones. Por consiguiente, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más

contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier método disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosídico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa hidroxi, tal como ácido cítrico o tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica, tal como una

amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero de modo no taxativo, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

Según se emplea en la presente, el término "**solvato**" significa un compuesto que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente como agua, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y diclorometano de etanolamina, 2-propanol o similares, unidos por fuerzas intermoleculares no covalentes. Los solvatos o los hidratos de los compuestos se preparan fácilmente mediante el añadido de al menos un equivalente molar de un disolvente hidroxílico como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol o agua al compuesto para producir la solvatación o hidratación del resto imina.

Los términos "**crecimiento celular anormal**" y "**trastorno proliferativo**" se utilizan indistintamente en la presente solicitud. "**Crecimiento celular anormal**", según se emplea en la presente, a menos que se indique lo contrario, se refiere al crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (p. ej., pérdida de la inhibición por contacto). Esto incluye, por ejemplo, el crecimiento anormal de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan mediante la expresión de una tirosina cinasa mutada o la sobreexpresión de una tirosina cinasa receptora; (2) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las cuales se produce la activación de la tirosina cinasa aberrante; (3) cualquier tumor que prolifera mediante tirosina cinasas receptoras; (4) cualquier tumor que prolifera mediante la activación de serina/treonina cinasa aberrante; y (5) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las cuales se produce la activación de la serina/treonina cinasa aberrante. Los términos "**cáncer**" y "**canceroso**" describen o hacen referencia a la afección fisiológica en mamíferos, la que se encuentra normalmente caracterizada por el crecimiento celular

no regulado. Un "**tumor**" comprende una o más células cancerosas y/o benignas o células precancerosas.

Un "**agente terapéutico**" abarca un agente biológico como un anticuerpo, un péptido, una proteína, una enzima o un agente quimioterapéutico.

Un "**agente quimioterapéutico**" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Un "**metabolito**" es un producto producido mediante el metabolismo en el cuerpo de un compuesto específico, un derivado de este o un conjugado de este, o una sal de este. Los metabolitos de un compuesto, un derivado de este o un conjugado de este se pueden identificar utilizando técnicas de rutina conocidas en la técnica y sus actividades se pueden determinar utilizando pruebas como las que se describen en la presente. Tales productos pueden ser el resultado, por ejemplo, de oxidación, hidroxilación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares del compuesto administrado. En consecuencia, la invención incluye metabolitos de compuestos, un derivado de estos o un conjugado de estos, de la invención,

incluido compuestos, un derivado de estos o un conjugado de estos, producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto, un derivado de este o un conjugado de este, de la presente invención con un mamífero durante un período suficiente para producir un producto metabólico de este.

La frase "**farmacéuticamente aceptable**" indica que la sustancia o la composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes comprendidos en una formulación y/o el mamífero que se trata con estos.

El término "**grupo protector**" o "**resto protector**" se refiere a un sustituyente que comúnmente se emplea para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras hace reaccionar otros grupos funcionales en el compuesto, un derivado de este o un conjugado de este. Por ejemplo, un "**grupo protector amina**" o un "**resto protector amino**" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad del amino en el compuesto. Estos grupos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, P. Wuts y T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, capítulo 7, J. Wiley & Sons, NJ)

y se ejemplifican por carbamatos como carbamato de metilo y etilo, FMOC, carbamatos de etilo sustituidos, carbamatos escindidos por eliminación de 1,6-β (también denominada "**autodestructivo**"), derivados de alquilo, arilo, ureas, amidas y péptidos. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). Para encontrar una descripción general de grupos protectores y su uso, véase P. G.M. Wuts y T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 2007.

El término "**grupo saliente**" se refiere a un grupo de resto cargado o no cargado que parte durante una sustitución o desplazamiento. Dichos grupos salientes son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, halógenos, ésteres, alcoxi, hidroxilo, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, carbamato, disulfuros, tioéteres, tioésteres y compuestos de diazonio.

El término "**agente de reticulación bifuncional**", "**enlazador bifuncional**" o "**agentes de reticulación**" se refiere a agentes

modificadores que poseen dos grupos reactivos; uno de los cuales es capaz de reaccionar con un agente de unión celular, mientras que el otro reacciona con el compuesto citotóxico para unir los dos restos. Dichos reticuladores bifuncionales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Isalm y Dent en *Bioconjugation,* capítulo 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. Nueva York, 1999). Por ejemplo, los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión a través de un enlace de tioéter incluyen *N*-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para introducir grupos maleimido o con *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. Otros agentes de reticulación bifuncionales que introducen grupos maleimido o grupos haloacetilo a un agente de unión celular se conocen en la técnica (véanse las solicitudes de patente estadounidense 2008/0050310, 20050169933, disponible de Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, EUA) e incluyen, entre otros, bis-maleimidopolietilenglicol (BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, éster de N-(β-maleimidopropiloxi)succinimida (BMPS), ácido γ-maleimidobutírico éster de N-succinimidilo (GMBS),

éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), NHS de ácido 5-maleimidovalérico, HBVS, N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida o sal HCl de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), éster de N-succinimidilo de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), éster de N-(γ-maleimidobutriloxi)sulfosuccinimda (sulfo-GMBS), éster

de N-(ε-maleimidocaproiloxi)sulfosuccimido (sulfo-EMCS), éster de N-(κ-maleimidoundecanoiloxi)sulfosuccinimida (sulfo-KMUS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB).

Los agentes de reticulación heterobifuncionales son agentes de reticulación bifuncionales que tienen dos grupos reactivos diferentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales que contienen un grupo *N*-hidroxisuccinimida reactivo a amina (grupo NHS) y un grupo hidrazina reactivo a carbonilo también se pueden utilizar para unir los compuestos citotóxicos descritos en la presente con un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo). Algunos ejemplos de dichos agentes de reticulación heterobifuncionales disponibles a nivel comercial incluyen hidrazona de acetona de 6-hidrazinonicotinamida de succinimidilo (SANH), clorhidrato de 4-hidrazidotereftalato de succinimidilo (SHTH) y clorhidrato de nicotinato de hidrazinio de succinimidilo (SHNH). Los conjugados que poseen un enlazador lábil al ácido también se pueden preparar utilizando un derivado de benzodiazepina que posee hidrazina de la presente invención. Algunos ejemplos de agentes de reticulación

bifuncionales que se pueden utilizar incluyen benzoato de succinimidil-p-formilo (SFB) y succinimidil-p-formilfenoxiacetato (SFPA).

Los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión del agente de unión celular con compuestos citotóxicos mediante enlaces disulfuro se conocen en la técnica e incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. En la técnica se conocen otros agentes de reticulación bifuncionales que pueden usarse para introducir grupos disulfuro y se describen en las patentes estadounidenses 6.913.748, 6.716.821 y en las publicaciones de patentes estadounidenses 20090274713 y 20100129314, que se incorporan a la presente mediante esta referencia. Alternativamente, también se pueden utilizar agentes de reticulación como 2-iminotiolano, tiolactona de homocisteína o anhídrido de S-acetilsuccínico que introducen grupos tiol.

Un "**enlazador**", un "**resto enlazador**" o un "**grupo de unión**",

según se define en la presente, se refiere a un resto que conecta dos grupos, como un agente de unión celular y un compuesto citotóxico. Típicamente, el enlazador es sustancialmente inerte en las condiciones para las cuales los dos grupos que conecta están unidos. Un agente de reticulación bifuncional puede comprender dos grupos reactivos, uno en cada extremo de un resto enlazador, de modo que se pueda hacer reaccionar primero un grupo reactivo con el compuesto citotóxico para proporcionar un compuesto que tiene el resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del agente de reticulación bifuncional se puede hacer reaccionar primero con el agente de unión celular para proporcionar un agente de unión celular que posee un resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles al ácido, enlaces

fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasa y enlaces lábiles a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces lábiles a peptidasa y tioéter. Otros enlazadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, como los que se describen detalladamente en la publicación estadounidense número 20050169933 o enlazadores cargados o enlazadores hidrofílicos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976, cada uno de los cuales se incorpora expresamente a la presente mediante esta referencia. En una modalidad, el grupo enlazador con un grupo reactivo unido en un extremo, por ejemplo un éster reactivo, se selecciona de los siguientes:

$-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}{=}CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{alquinil})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

-

$O(CR_{20}R_{21})_m(\text{piperazino})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$

,

$-O(CR_{20}R_{21})_m(\text{pirrolo})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-O(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{alquinil})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

-

$S(CR_{20}R_{21})_m(\text{piperazino})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$

,

$-S(CR_{20}R_{21})_m(\text{pirrolo})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-S(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$
$(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

-

$NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(\text{alquinil})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q-$
$(CO)_tX''$,

-

$NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(\text{piperazino})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25}$
$)_q$

$(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(\text{pirrolo})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q^-$

$(CO)_tX''$,

$-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q$

$(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(\text{alkynyl})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

-

$(CR_{20}R_{21})_m(\text{piperazino})_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-$

$NR_{30})_{n''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$

$(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(\text{alquinil})_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''$

$(CR_{24}R_{25})_q^-(CO)_tX''$,

$-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q$

$(CO)_tX''$,

en donde:

m, n, p, q, m′, n′, t′ son enteros entre 1 y 10, o son opcionalmente 0;

t, m″, n″ y p″ son 0 o 1;

X″ se selecciona de OR_{36}, SR_{37}, $NR_{38}R_{39}$, en donde R_{36}, R_{37}, R_{38}, R_{39} son H, o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono y, o, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, R_{37} es, opcionalmente, un grupo protector tiol cuando t = 1, COX′′ forma un éster reactivo seleccionado de ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxiftalimida, ésteres de N-hidroxi sulfo-succinimida, ésteres de para-nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo y sus derivados, en donde dichos derivados facilitan la formación de enlace amida;

Y′′ está ausente o se selecciona de O, S, S-S o NR_{32}, en donde R_{32} tiene la misma definición que se proporcionó anteriormente para R; o

cuando Y″ no es S-S y t = 0, X″ se selecciona de un grupo maleimido, un grupo haloacetilo o SR_{37}, en donde R_{37} tiene la misma definición que la anterior;

A″ es un residuo de aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos;

R_{20}, R_{21}, R_{22}, R_{23}, R_{24}, R_{25}, R_{26} y R_{27} son los mismos o diferentes, y son -H o un alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 5 átomos de carbono;

R_{29} y R_{30} son los mismos o diferentes y son -H o alquilo entre 1 y 5 átomos de carbono;

R_{33} es -H o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 12 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $R-(OCH_2CH_2)_n-$, o R_{33} es $-COR_{34}$, $-CSR_{34}$, $-SOR_{34}$ o $-SO_2R_{34}$, en donde R_{34} es H o alquilo, alquenilo, alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono o una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$; y

uno de R_{40} y R_{41} es opcionalmente un grupo funcional cargado negativa o positivamente y el otro es H o alquilo, alquenilo, alquilo que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono.

Cualquiera de los grupos enlazadores anteriores puede estar presente en cualquiera de los compuestos, compuestos de fármaco-enlazador o conjugados de la invención, incluso reemplazando los grupos enlazadores de cualquiera de las

fórmulas descritas en la presente.

El término "**aminoácido**" se refiere a aminoácidos de origen natural o un aminoácido de origen no natural. En una modalidad, el aminoácido está representada por NH_2-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)OH, en donde R^{aa} y $R^{aa'}$ son cada uno independientemente H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterociclilo, o R^{aa} y el átomo de nitrógeno de extremo N pueden formar juntos un anillo heterocíclico (p. ej., en la prolina). El término "**residuo de aminoácido**" se refiere al residuo correspondiente cuando se retira un átomo de hidrógeno del extremo carboxi y/o amina del aminoácido, como -NH-C($R^{aa'}R^{aa}$)-C(=O)O-.

El término "**catión**" se refiere a un ion con carga positiva. El catión puede ser monovalente (p. ej., Na^+, K^+, etc.), bivalente (p. ej., Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) o multivalente (p. ej., Al^{3+}, etc.). Preferentemente, el catión es monovalente.

El término "**cantidad terapéuticamente eficaz**" significa la cantidad de compuesto activo o conjugado que produce la respuesta biológica deseada en un sujeto. Dicha respuesta

incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando, la prevención, la inhibición o un retraso en la recurrencia de los síntomas de la enfermedad o de la propia enfermedad, un aumento en la longevidad del sujeto en comparación con la ausencia del tratamiento, o la prevención, la inhibición o el retraso en el avance de los síntomas de la enfermedad o de la propia enfermedad. Los expertos en la técnica son capaces de determinar las cantidades eficaces, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en la presente. Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica del compuesto I mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares y en animales experimentales. La cantidad eficaz de compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se vaya a administrar a un sujeto dependerá de la etapa, la categoría y el estado del mieloma múltiple y las características del sujeto, como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia al fármaco. La cantidad eficaz de compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se vaya a administrar también dependerá de la

vía de administración y la forma de dosificación. La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del compuesto activo que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados.

COMPUESTOS CITOTÓXICOS

En una primera modalidad, la presente invención se refiere a compuestos citotóxicos descritos en la presente (p. ej., compuestos de fórmula estructural (I), (II), (III), (IV), (V) o (VI) o una sal farmacéuticamente aceptable de esta). En determinadas modalidades, el compuesto citotóxico está representado por la fórmula estructural (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

En determinadas modalidades, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), uno de L', L" y L'" está representado por la fórmula (A) y los otros son cada uno independientemente –H, un alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono, halógeno, -OH, (C_1-C_6)alcoxi o $-NO_2$. Específicamente, uno de L', L" y L'" está representado por la fórmula (A) y los otros son –H.

En una 1ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), L′ está representada por la fórmula (A) y tanto L″ como L‴ son –H; y las variables restantes se describieron anteriormente en la primera modalidad.

En una 2ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), R_x es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con halógeno, –OH, (C_1-C_3)alquilo, (C_1-C_3)alcoxi, halo(C_1-C_3)alquilo, o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad de la 1ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, Q es i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$ o $-Z'-NR_{11}R_{12}$, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; o ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ o $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z′ es un alquileno opcionalmente sustituido, un cicloalquileno opcionalmente sustituido o un fenileno opcionalmente sustituido; R_{14} a R_{16} son cada uno independientemente un alquilo opcionalmente sustituido; y X^-

es un anión farmacéuticamente aceptable; y las variables restantes son como se describió arriba en la 2ª modalidad específica. Más específicamente, Q es $-SO_3H$ o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una 3ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), J es un resto que comprende un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en NHR^{c1}, -COOH y -COE, en donde -COE representa un éster reactivo y R^{c1} es -H o alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH o (C_1-C_3)alcoxi; y las variables restantes son como describió arriba en la primera modalidad o la 1ª o 2ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, J es COE seleccionado de éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxi sulfosuccinimida, éster de nitrofenilo (p. ej., 2 o 4-nitrofenilo), éster de dinitrofenilo (p. ej., 2,4-dinitrofenilo), éster de sulfo-tetraflurofenilo (p. ej., 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenilo) y éster de pentafluorofenilo; y las variables restantes son como describió arriba en la 3ª modalidad específica. Más

específicamente, COE es un éster de N-hidroxisuccinimida.

En una 4ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), L' está representado por la siguiente fórmula:

$$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J \quad (B1);$$

$$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J \quad (B2);$$

$$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-J \quad (C1); \text{ o}$$

$$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J \quad (C2),$$

en donde:

J es –COE;

R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente –H, (C_1-C_3)alquilo o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q;

m es un entero entre 1 y 6;

m' es 0 o un entero entre 1 y 6;

Cy es un alquilo cíclico que tiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH, (C_1-C_3)alquilo, (C_1-C_3)alcoxi o halo(C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª o 3ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, ambos R_a y R_b son H; Cy para las fórmulas (B2) y (C2) es ciclohexano; y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió arriba en la 4ª modalidad específica. Más específicamente, m′ en las fórmulas (B2) y (C2) es 0 o 1.

En una 5ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), L′ está representado por la siguiente fórmula:

$$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s \quad (B3); \text{ o}$$

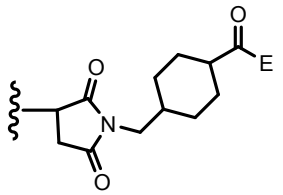
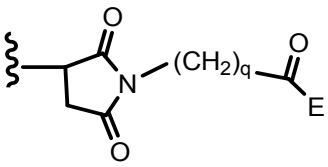
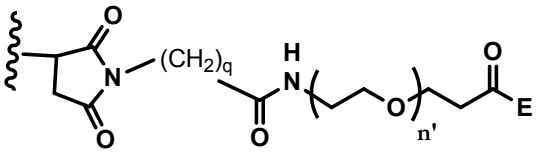
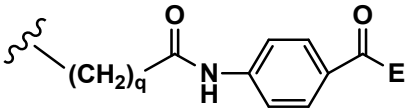
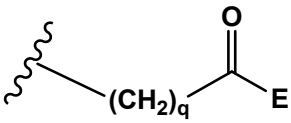
$$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^s \quad (C3),$$

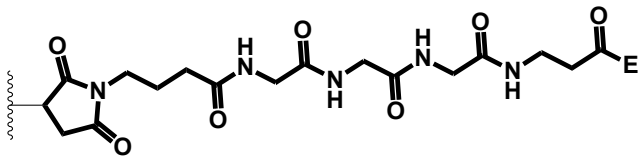
en donde:

R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente –H, (C_1-C_3)alquilo o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q;

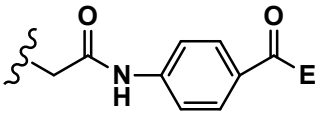
m es un entero entre 1 y 6;

Z^s es –H, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ o se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:

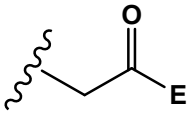

(a1′);

(a2′);

(a3′);

(a4′);

(a5′);



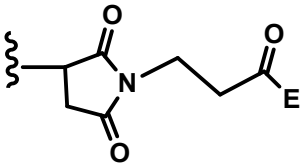
(a10′);



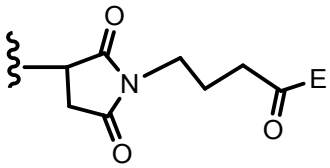
(a11′);



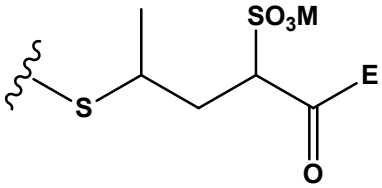
(a12′);



(a13′);



(a14′);



(a15′);

en donde:

q es un entero entre 1 y 5;

n′ es un entero de 2 a 6;

M es un catión (p. ej., H^+, Na^+ o K^+);

R^d es un alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono o se selecciona de fenilo, nitrofenilo (p.

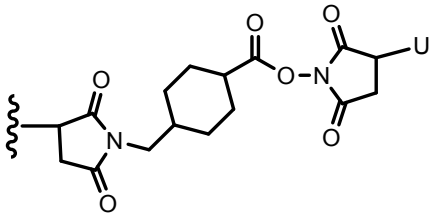
ej., 2 o 4-nitrofenilo), dinitrofenilo (p. ej., 2,4-dinitrofenilo), carboxinitrofenilo (p. ej., 3-carboxi-4-nitrofenilo), piridilo o nitropiridilo (p. ej., 4-nitropiridilo);

R^{d1} es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono;

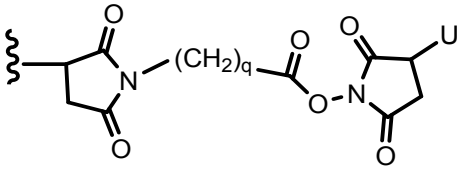
y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª o 4ª modalidad específica.

En una modalidad, Z^s es –H. En otra modalidad, Z^s es –SMe o –SPy (Py es un piridilo).

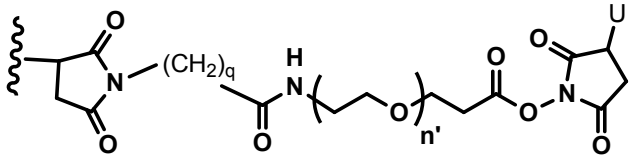
En aun otra modalidad, Z^s se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:



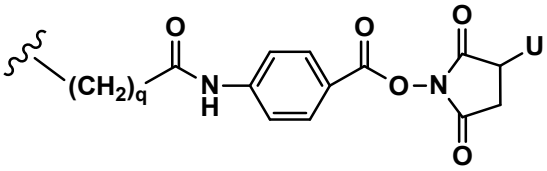
(a1);



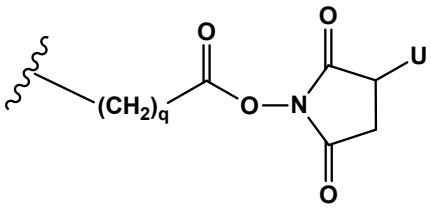
(a2);



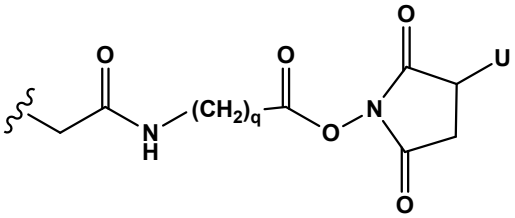
(a3);



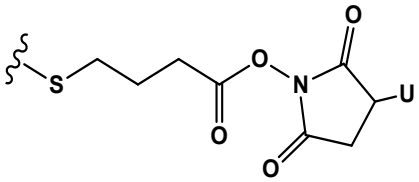
(a4);



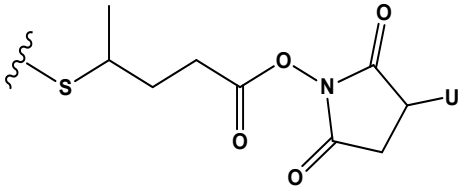
(a5);



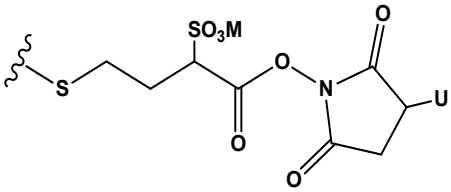
(a6);



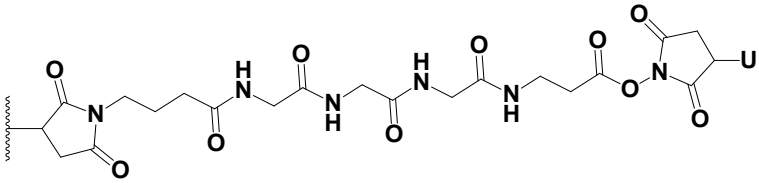
(a7);



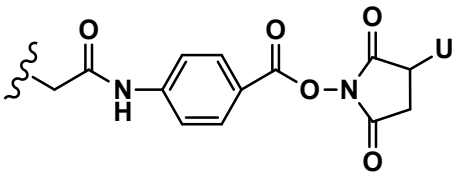
(a8);



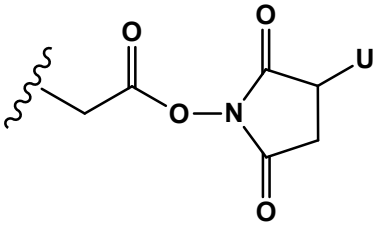
(a9);



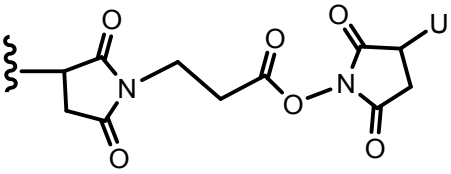
(a10);



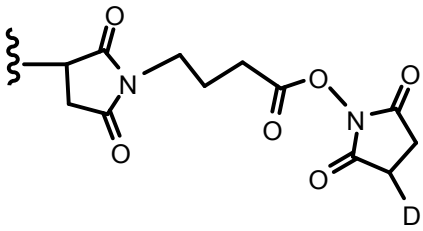
(a11);



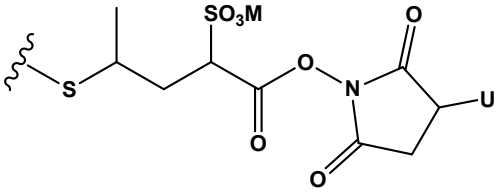
(a12);



(a13);



(a14) o



(a15);

en donde U es -H o $-SO_3M$; y las variables restantes son como se describió arriba para las fórmulas (a1')-(a15').

En determinadas modalidades, el sustituyente cargado o un grupo ionizable Q es i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$ o $-Z'-NR_{11}R_{12}$, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; o ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ o $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' es un alquileno opcionalmente sustituido, un cicloalquileno opcionalmente sustituido o un fenileno opcionalmente sustituido; R_{14} a R_{16} son cada uno independientemente un alquilo opcionalmente sustituido; y X^- es un anión farmacéuticamente aceptable; y las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica. Más específicamente, Q es $-SO_3H$ o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En determinadas modalidades, ambos R_a y R_b son –H y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, $-(CR_aR_b)_m-$ es $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ y m" es un entero entre 1 y 5; las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica.

En una 6ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), P es un péptido que contiene entre 2 y 10 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª o 5ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P es un péptido que contiene entre 2 y 5 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosil-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-

D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met y Met-Ala; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P es Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala y D-Ala-D-Ala; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En una 7ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace doble; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª y 6ª modalidad específica.

En una 8ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple, X es –H o un grupo protector amina; e Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R,", un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido, $-SO_3H$, $-SO_2H$ y $-OSO_3H$; y las variables

restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª o 7ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, Y se selecciona de -H, $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt o –NHOH, en donde M es –H, Na^+ o K^+; y las variables restantes son como se describió arriba en la 8ª modalidad específica. Más específicamente, Y es -H, $-SO_3M$ o –OH.

En una 9ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, y fenilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª o 8ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, X' es –H, -OH, (C_1-C_3)alquilo, halo(C_1-C_3)alquilo o fenilo; y las variables restantes son como se describió arriba en la 9ª modalidad específica. Más específicamente, X' es -H, -OH o –Me. Incluso más específicamente, X' es -H.

En una 10ª modalidad específica, para las fórmulas

estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), Y' es -H, un grupo oxo, (C_1-C_3)alquilo o halo(C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª o 9ª modalidad específica. Más específicamente, Y' es -H u oxo. Incluso más específicamente, Y' es –H.

En una 11ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), A y A' son el mismo o diferente, y se seleccionan de -O-, -S-, -NR_5- y oxo -(C=O)-; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª o 10ª modalidad específica. Más específicamente, A y A' son los mismos o diferentes y se seleccionan de -O- y -S-. Incluso más específicamente, A y A' son –O-.

En una 12ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), R_6 es –OMe; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª , 10ª o 11ª modalidad específica.

En una 13ª modalidad específica, para las fórmulas

estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son independientemente –H, halógeno, -NO_2, -OH, (C_1-C_3)alquilo, halo(C_1-C_3)alquilo o (C_1-C_3)alcoxi; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª o 12ª modalidad específica. Más específicamente, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son todos –H.

En una 14ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), R, R', R" y R_5 son cada uno independientemente –H o (C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª, 12ª o 13ª modalidad específica.

En una 15ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I), (II), (III), (IV), (V) y (VI), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple o enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble X está ausente e Y es –H, y cuando es un enlace simple, X es –H, Y es –OH o $-SO_3M$;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son todos -H;

R_6 es -OMe;

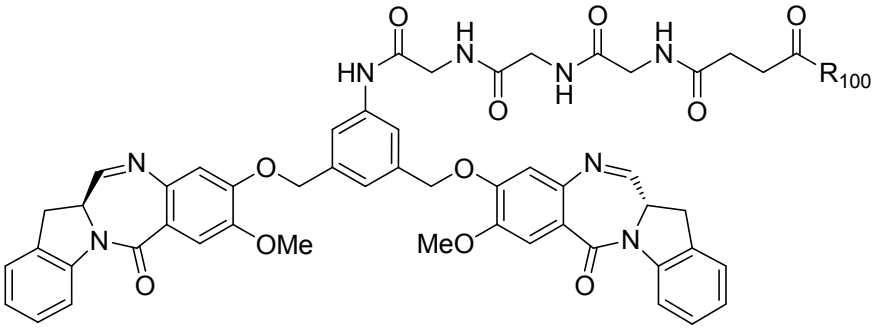
X' e Y' son -H;

A y A' son -O-;

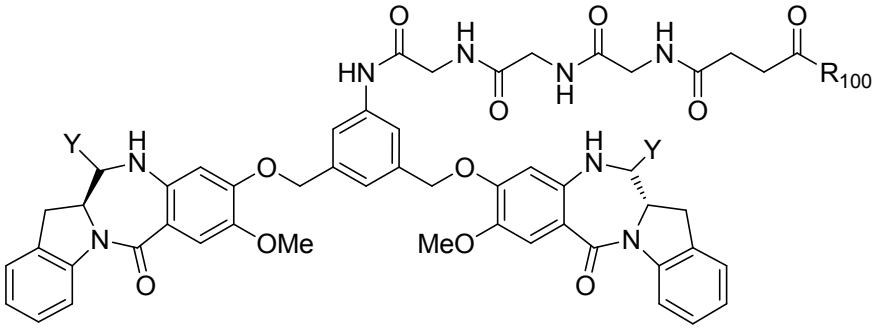
M es H, Na^+ o K^+; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª o 6ª modalidad específica.

En una 16ª modalidad específica, el compuesto citotóxico de la presente invención se selecciona de las siguientes

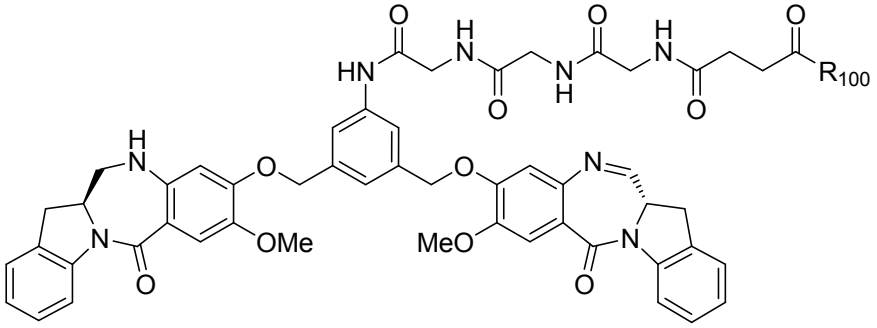
fórmulas:


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O

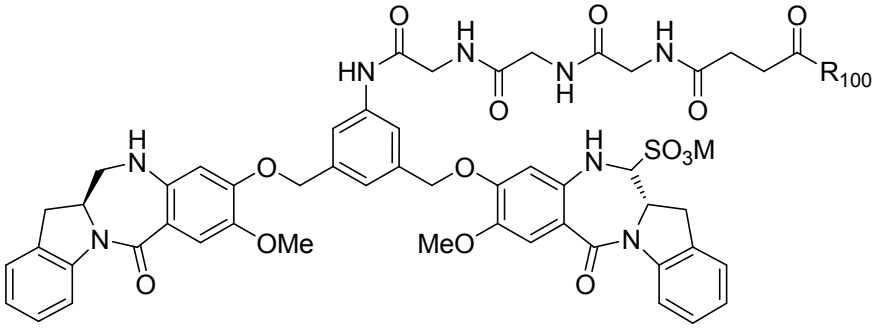
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
Y
H
N
N
H
Y
N
OMe
MeO
N
O
O

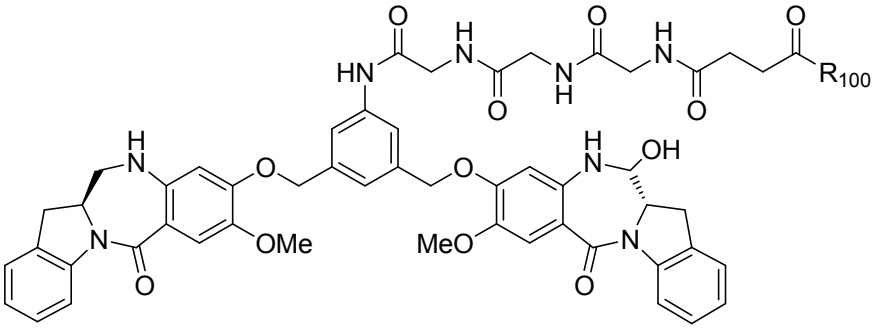
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
H
N
N
OMe
MeO
N
O
O

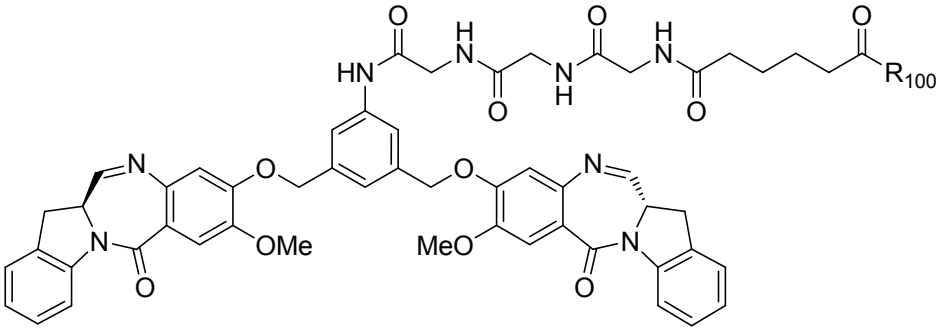
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
H
N
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

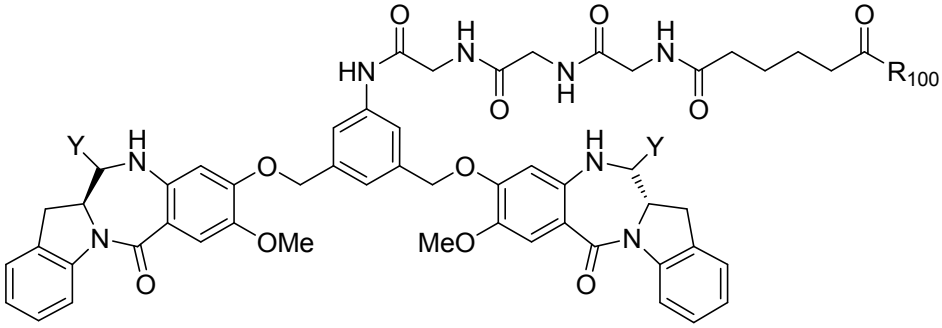
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
O
O

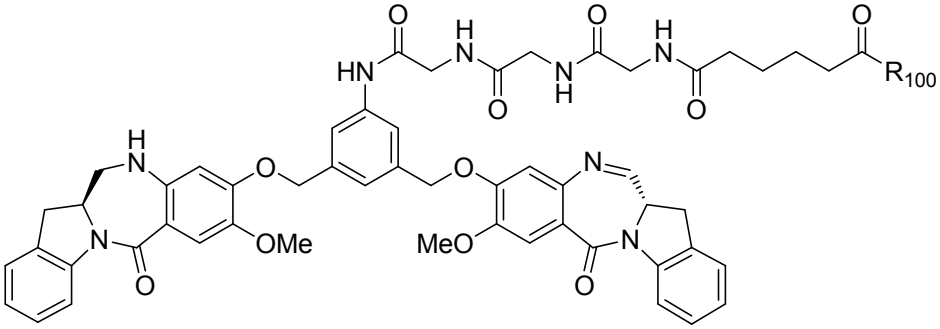
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O

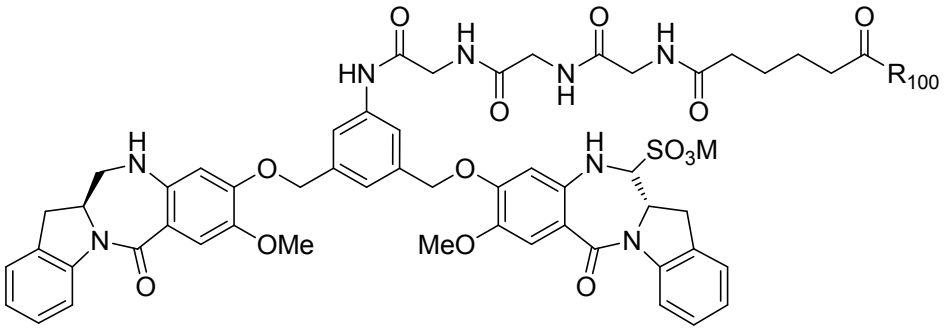
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O

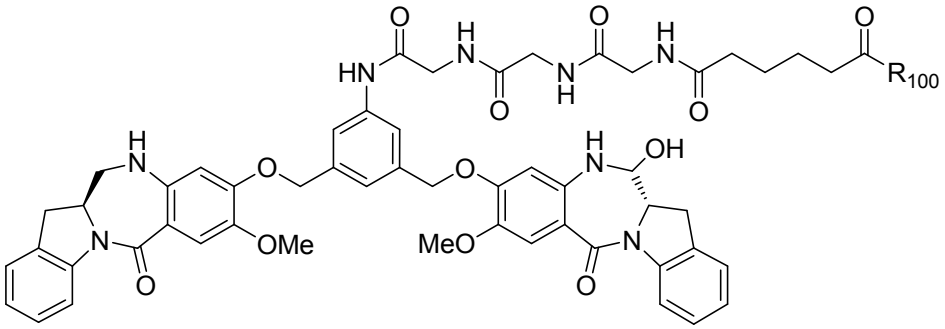
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O

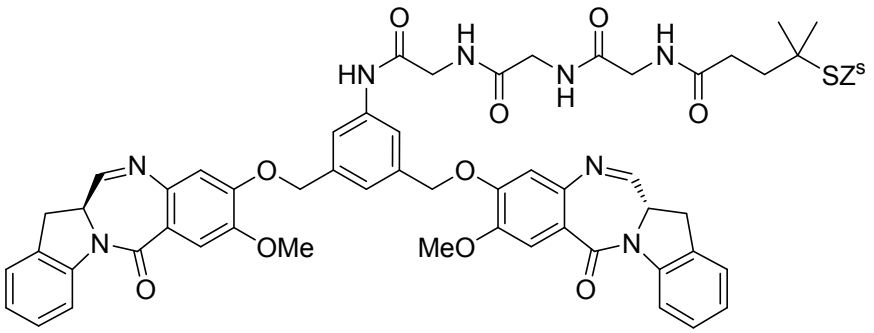
;



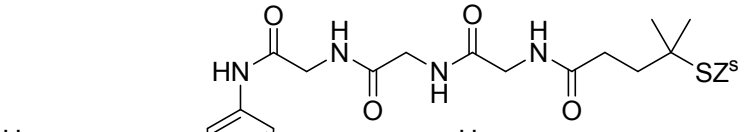
;

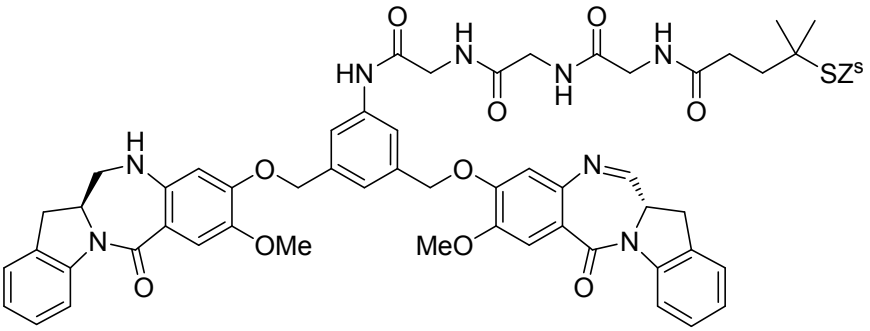


;

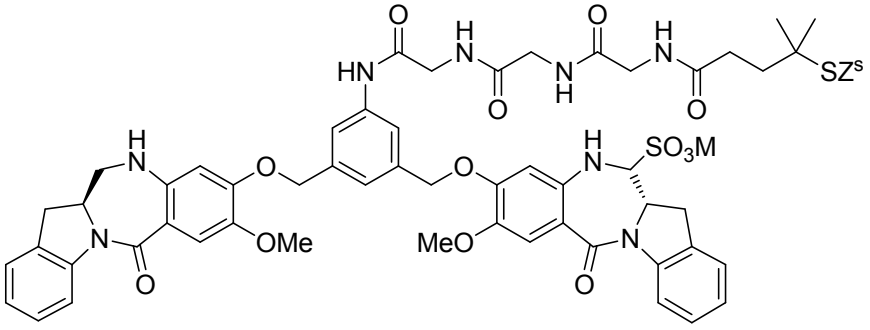


;

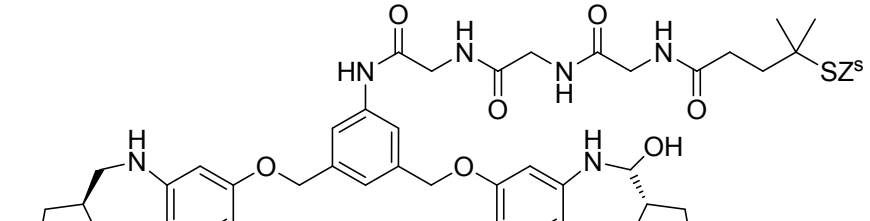


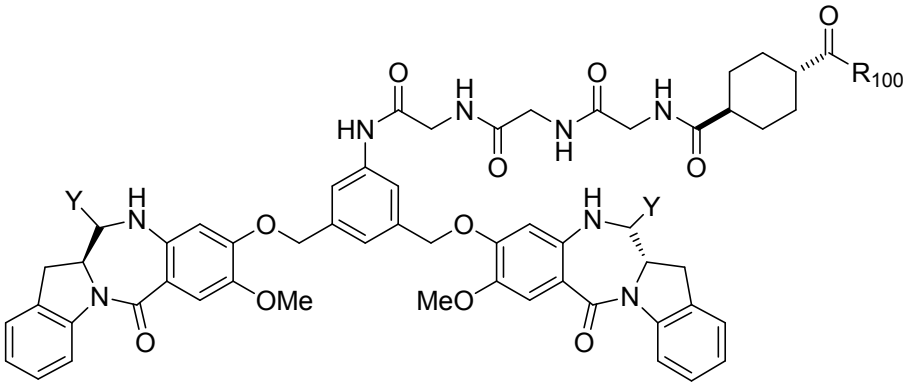

HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
SZ^s
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N

;

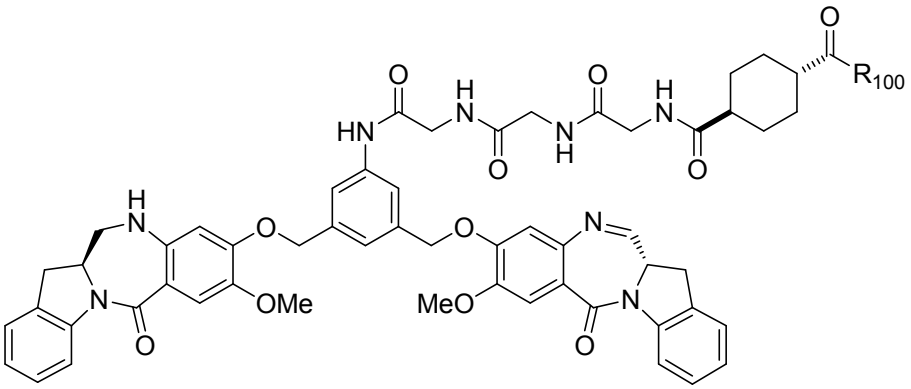

HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
SZ^s
H
N
O
O
H
N
SO$_3$M
OMe
MeO
N
O
O
N

;

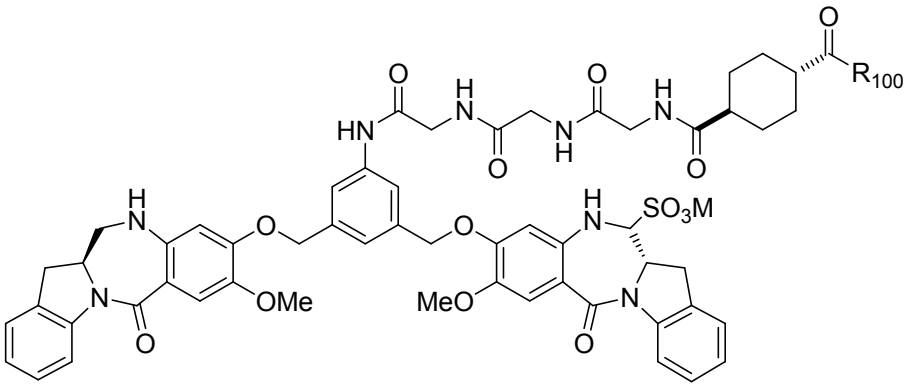

HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
SZ^s
H
N
O
O
H
N
OH


O
R100
O
H
N
O
H
N
HN
O
N
H
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O

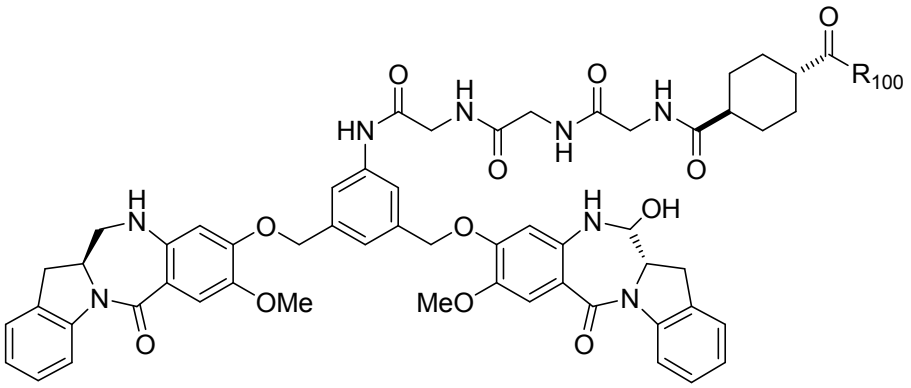
;


O
R100
O
H
N
O
H
N
HN
O
N
H
O
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O

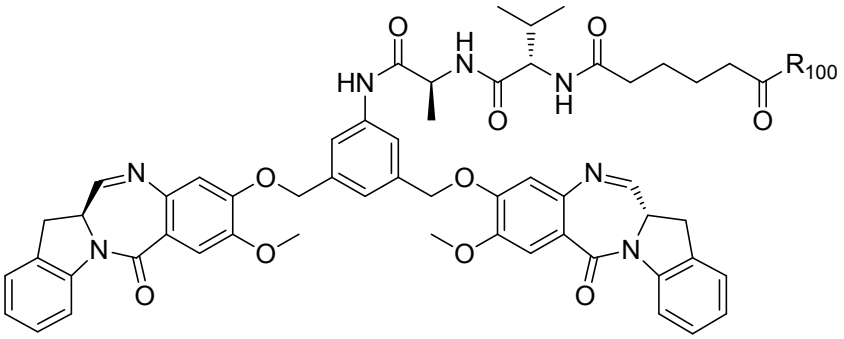
;


O
R100
O
H
N
O
H
N
HN
O
N
H
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

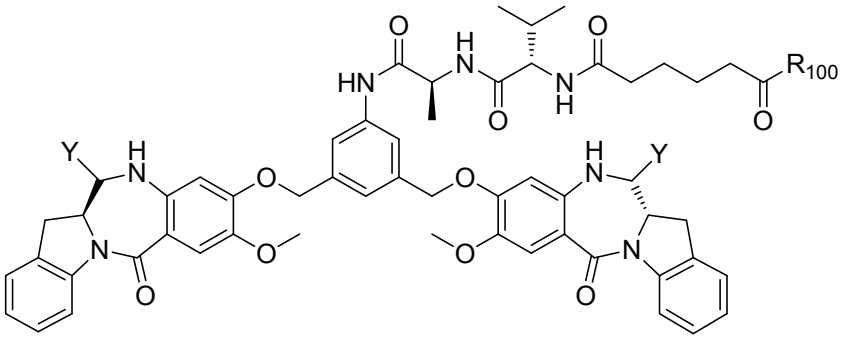
;


O
R100
O
H
N
O
H
N
HN
O
N
H
O
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O

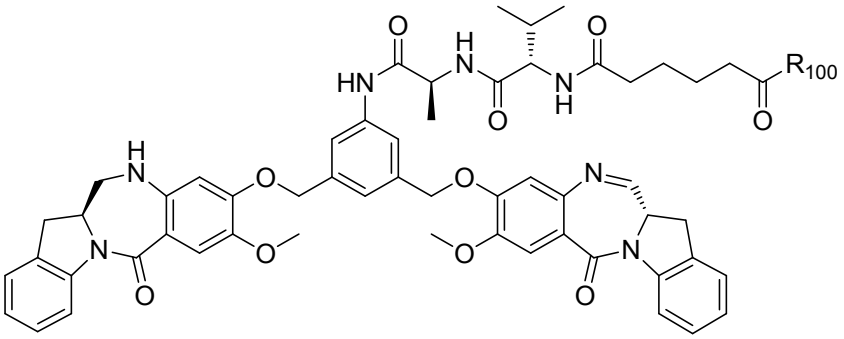
;


O
H
N
O
HN
N
H
R100
O
O
N
O
O
N
N
O
O
O
O
N
O
O
N
O

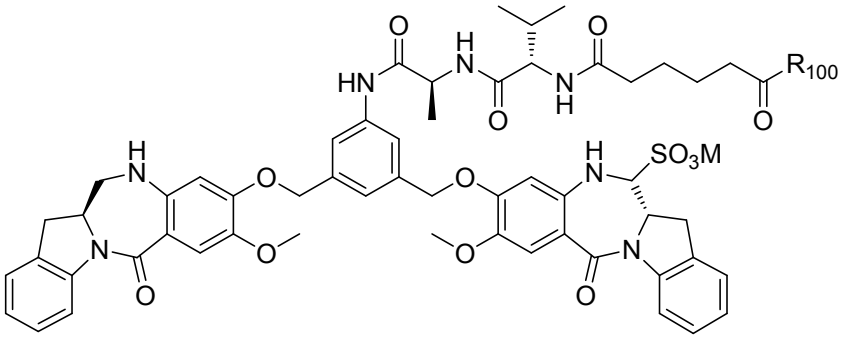
;


O
H
N
O
HN
N
H
R100
O
O
Y
H
N
H
N
Y
O
O
N
O
O
N
O
O
N
O
O
N
O

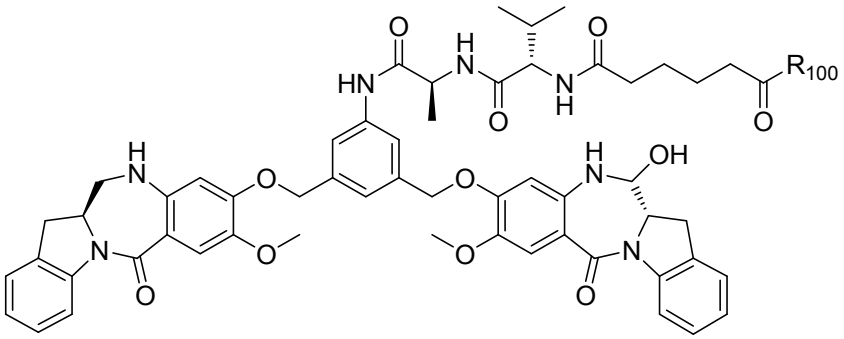
;


O
H
N
O
HN
N
H
R100
O
O
H
N
O
O
N
N
O
O
N
O
O
N
O
O
N
O

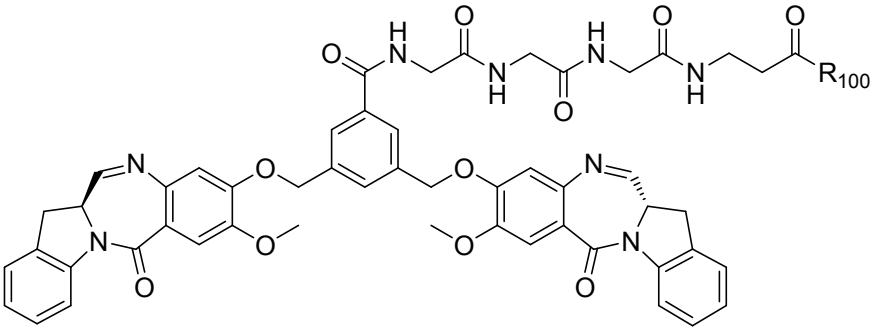
;


O
H
N
O
HN
N
H
R100
O
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
O
O
N
O
O
N
O
O
N
O

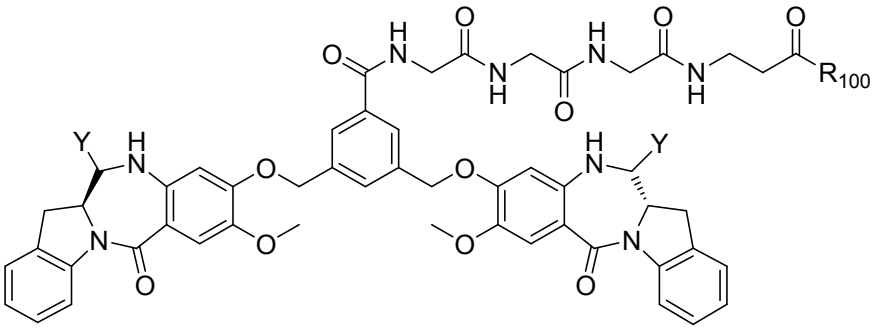
;



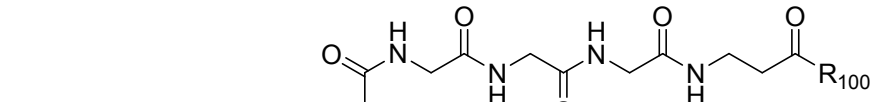
;

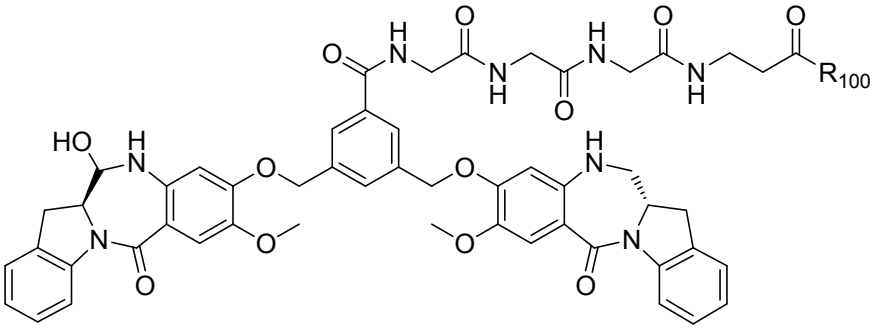


;

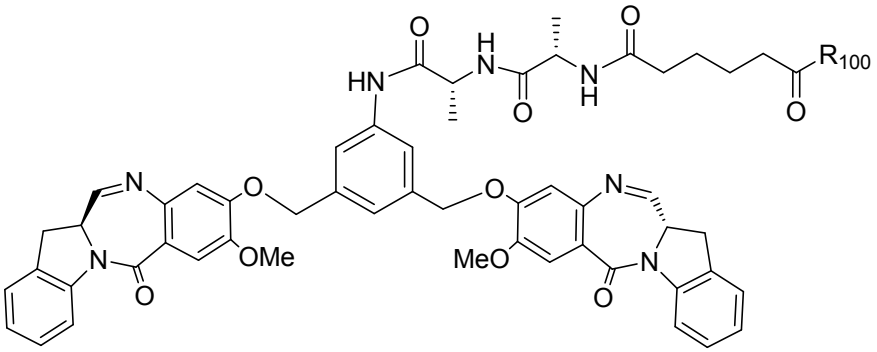


;



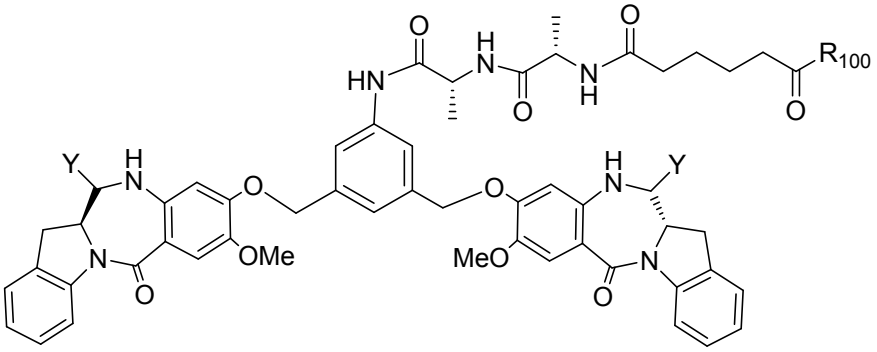


;

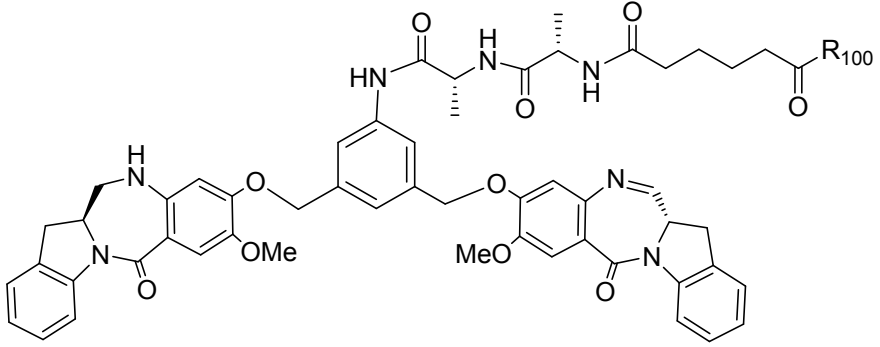


;

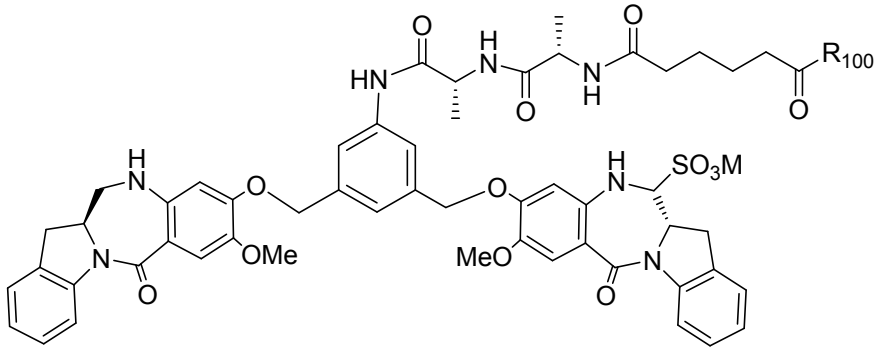
;



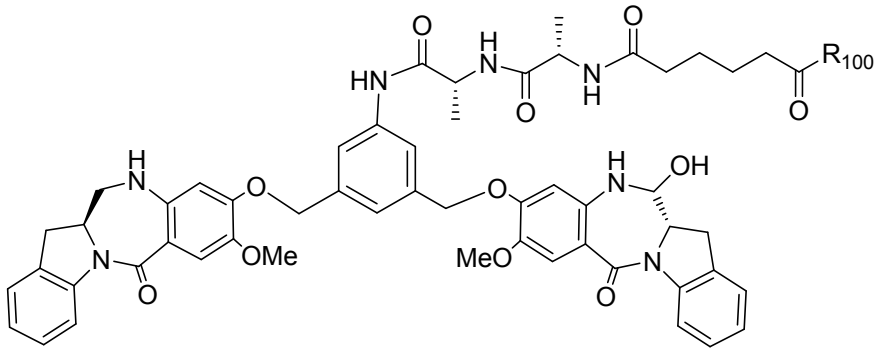
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
N
O
OMe
MeO
N
O
N
O

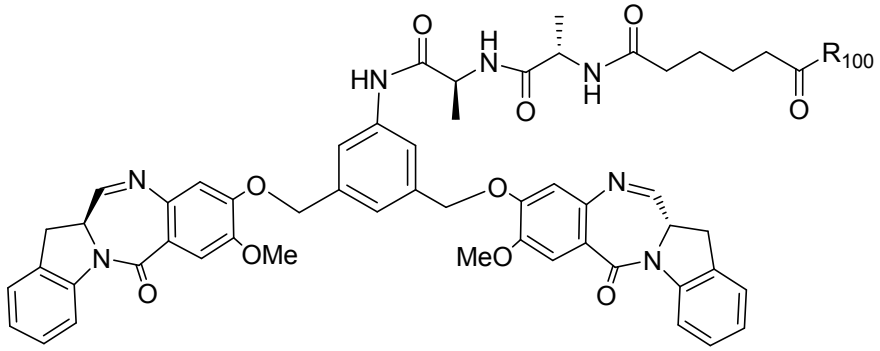
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
N
O
OMe
MeO
H
N
SO3M
N
O
O

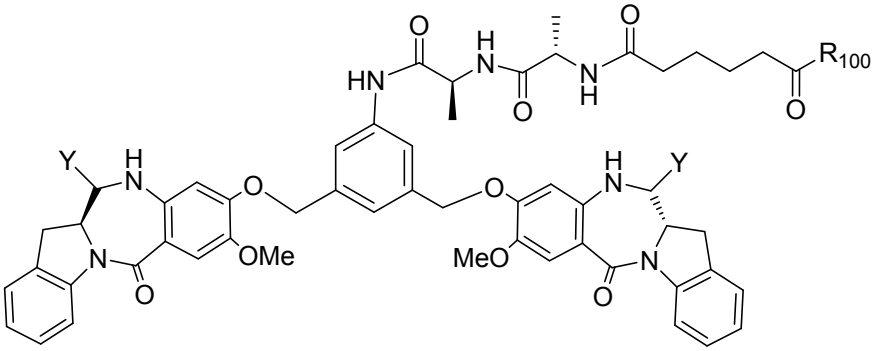
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
N
O
OMe
MeO
H
N
OH
N
O
O

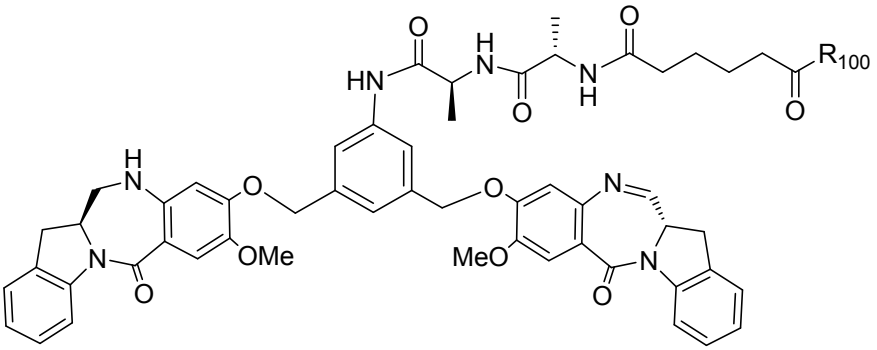
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
N
O
N
O
OMe
MeO
N
O
N
O

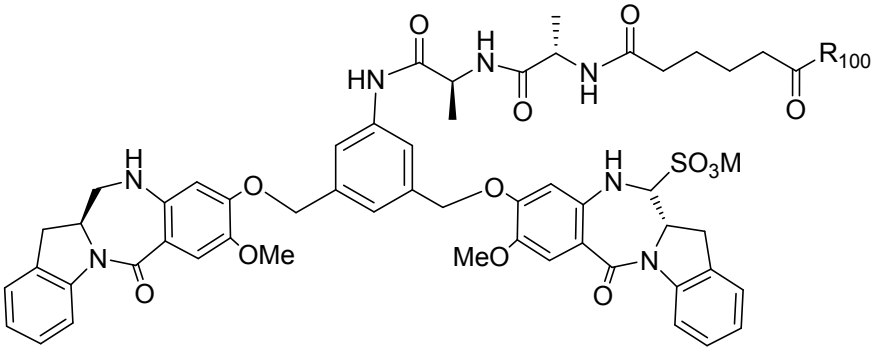
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
OMe
MeO
N
O
O
N

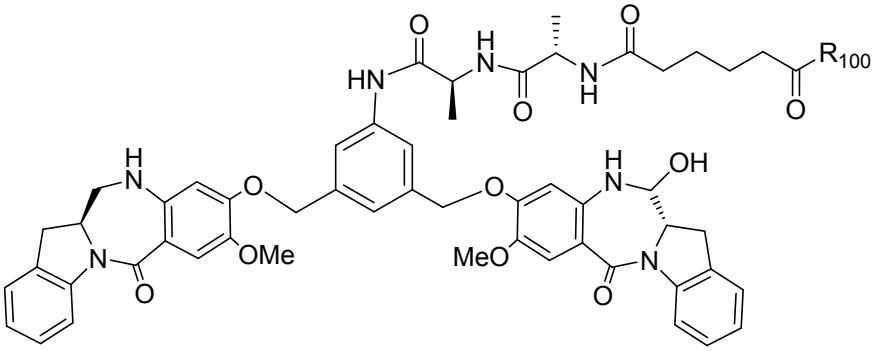
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N

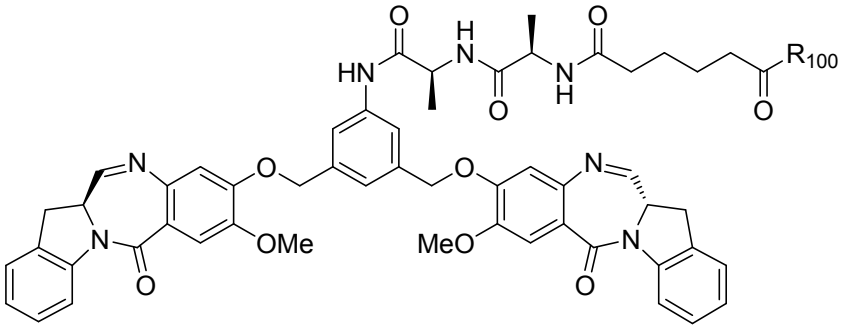
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
OMe
MeO
N
O
O
N

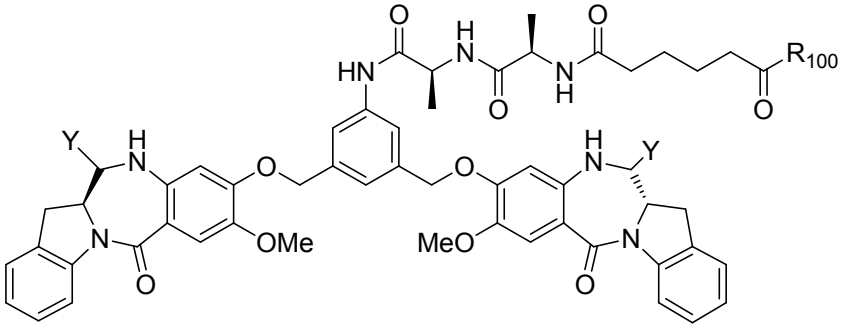
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
H
N
OH
OMe
MeO
N
O
O
N

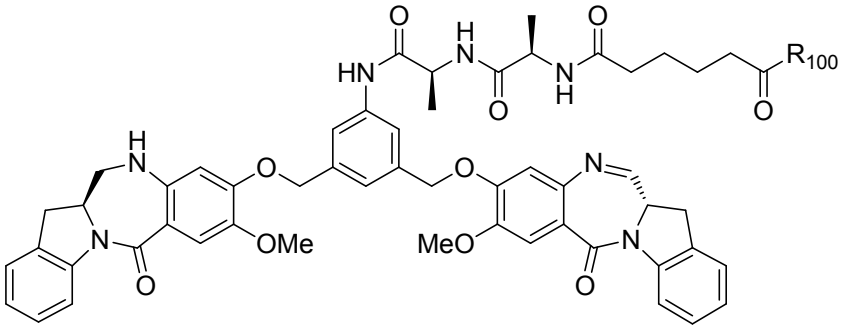
;


O
H
N
HN
O
N
H
O
R100
O
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O

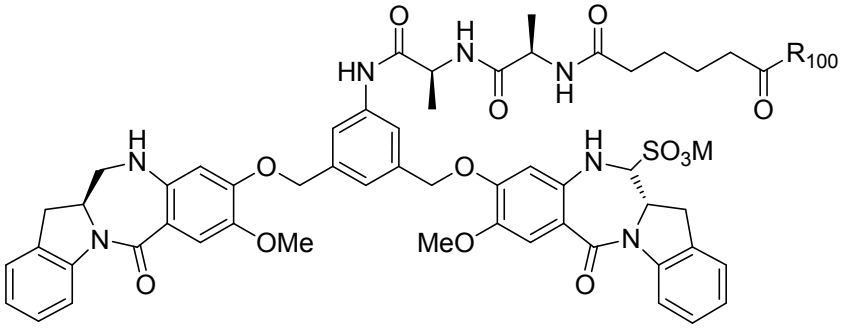
;


O
H
N
HN
O
N
H
O
R100
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O

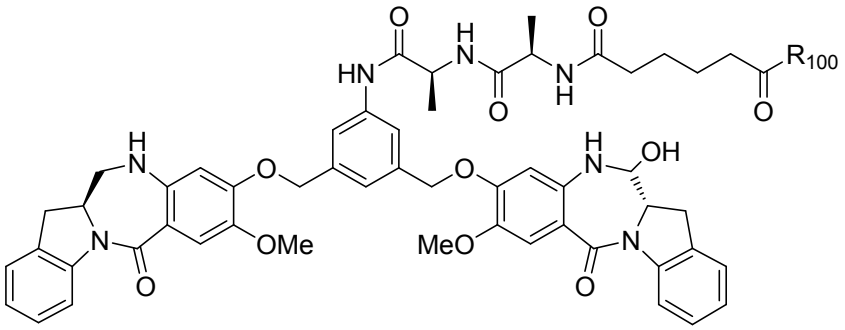
;


O
H
N
HN
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O

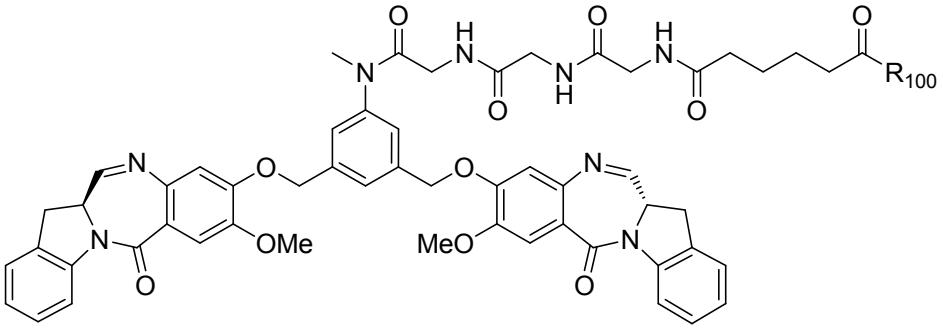
;


O
H
N
HN
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

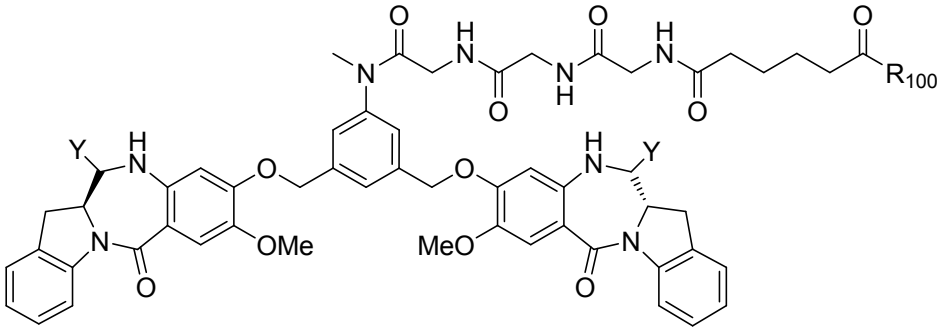
;


O
H
N
O
HN
N
H
R100
O
O
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
O
O
N

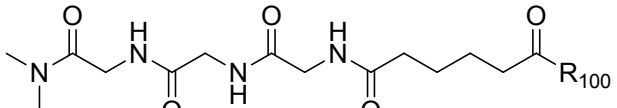
;

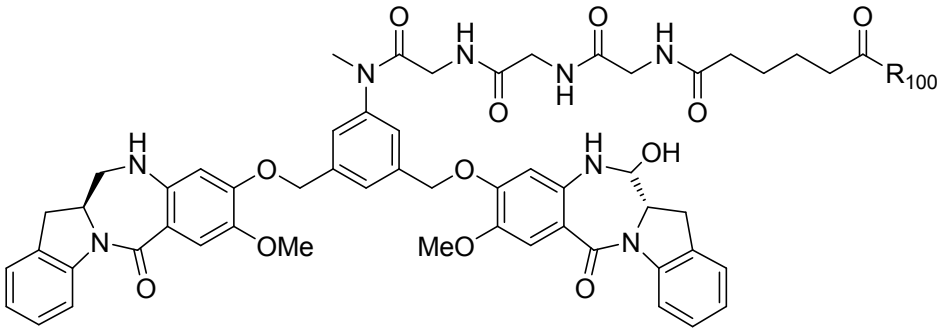

O
H
N
O
O
H
N
N
H
R100
O
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O
N

;

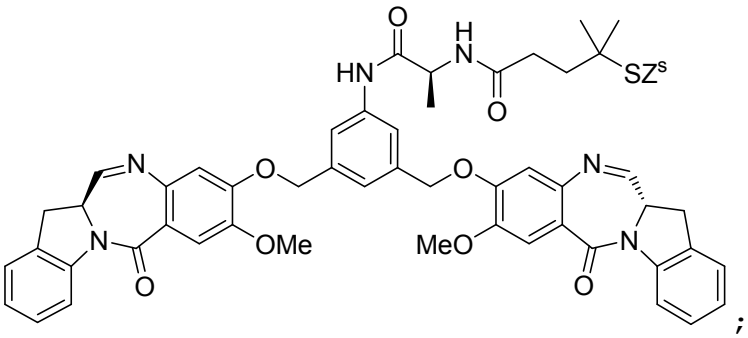

O
H
N
O
O
H
N
N
H
R100
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O
N

;

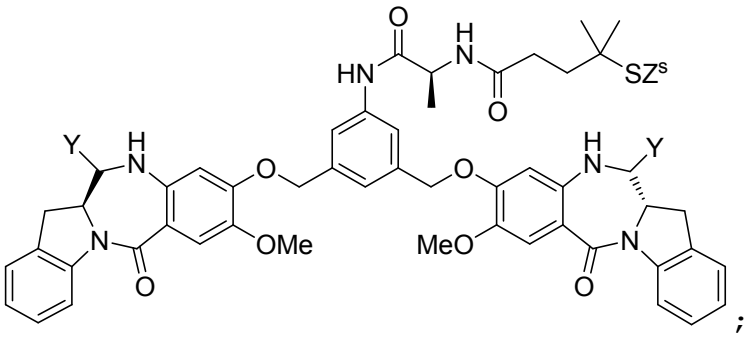

O
H
N
O
O
H
N
N
H
R100
O


O
H
N
O
H
N
O
R100
N
O
N
H
OH
H
N
O
O
N
OMe
MeO
O
O

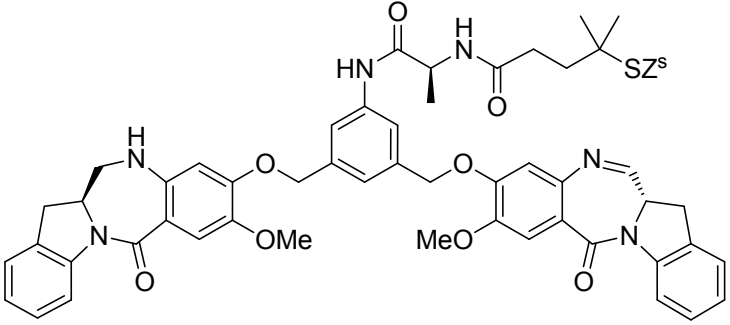
;

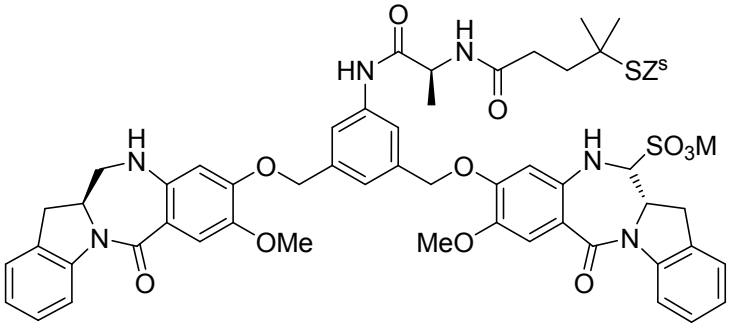

O
H
HN
N
SZs
O
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O

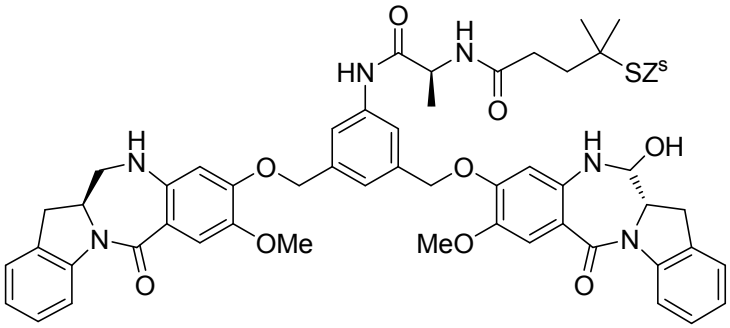
;

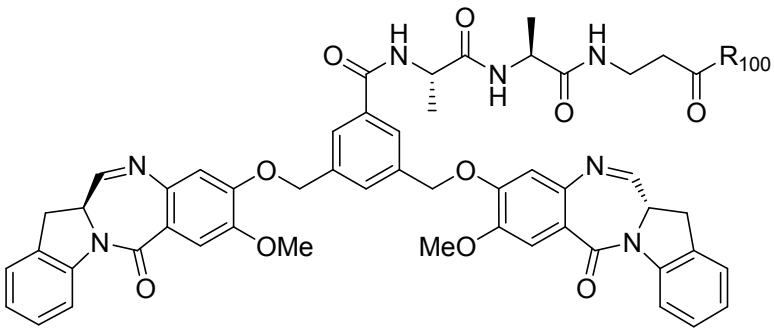

O
H
HN
N
SZs
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O

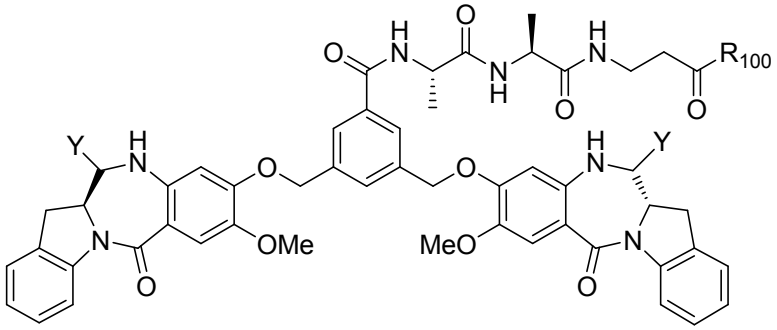
;


O
H
HN
N
SZ^s
O
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
N
O
O
;

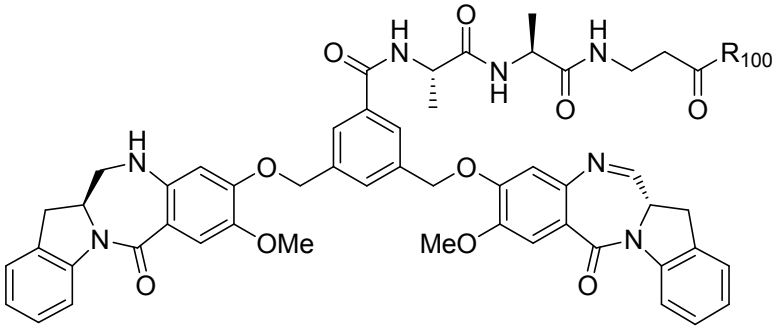

O
H
HN
N
SZ^s
O
H
N
O
O
H
N
SO$_3$M
OMe
MeO
N
N
O
O
;


O
H
HN
N
SZ^s
O
H
N
O
O
H
N
OH
OMe
MeO
N
N
O
O
;

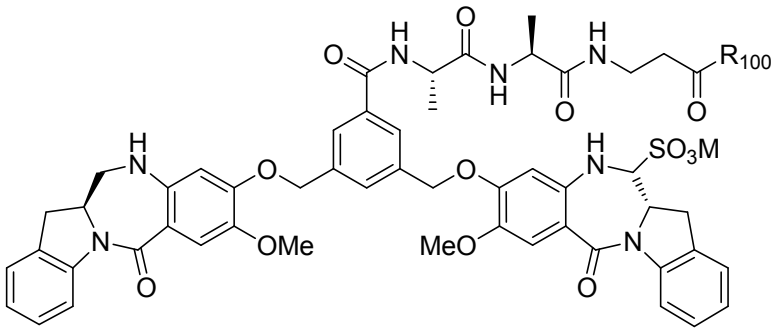

O
H
N
O
N
H
H
N
R$_{100}$
O
O
O
N
O
O
N
OMe
MeO
N
N
O
O
;


O
H
N
O
N
H
H
N
R100
O
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O

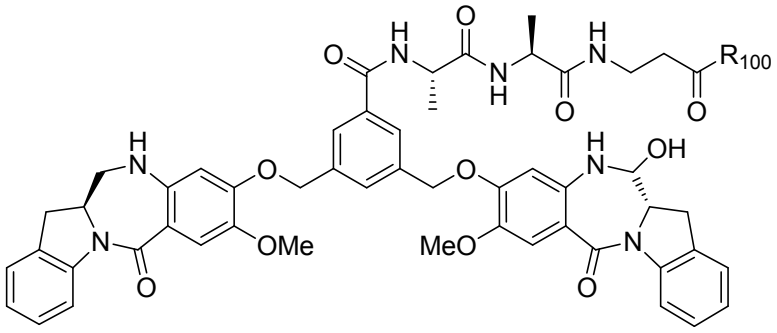
;


O
H
N
O
N
H
H
N
R100
O
O
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O

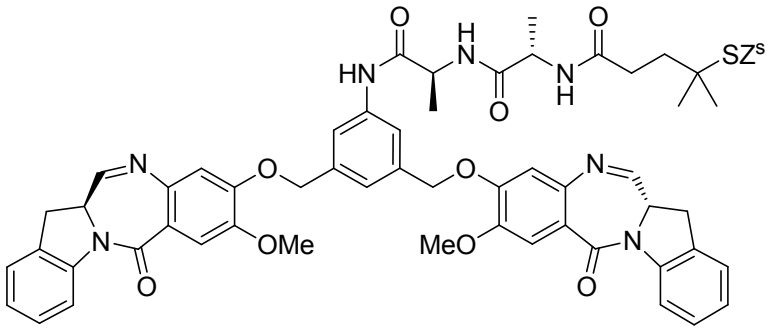
;


O
H
N
O
N
H
H
N
R100
O
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

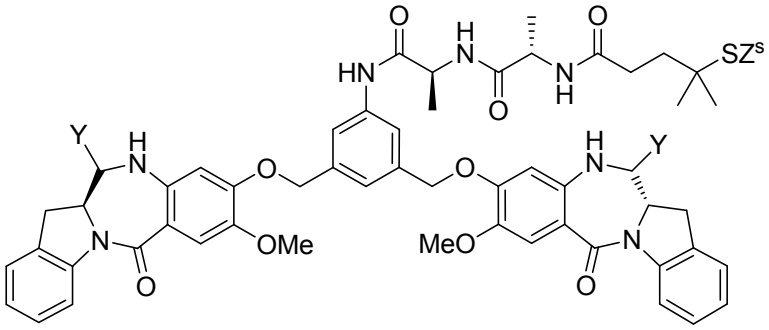
;


O
H
N
O
N
H
H
N
R100
O
O
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O

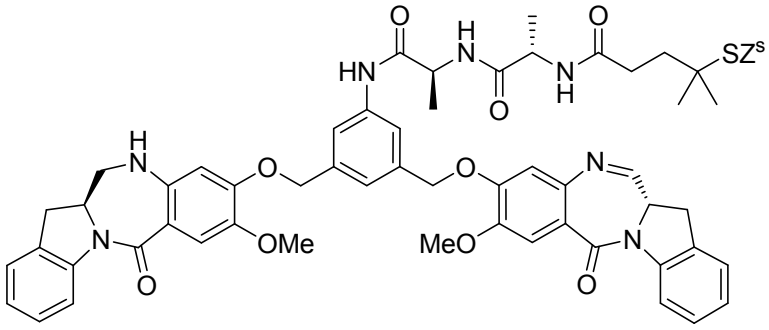
;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O

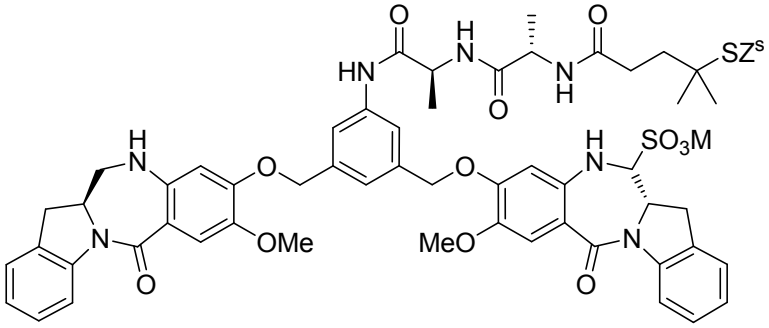
;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O

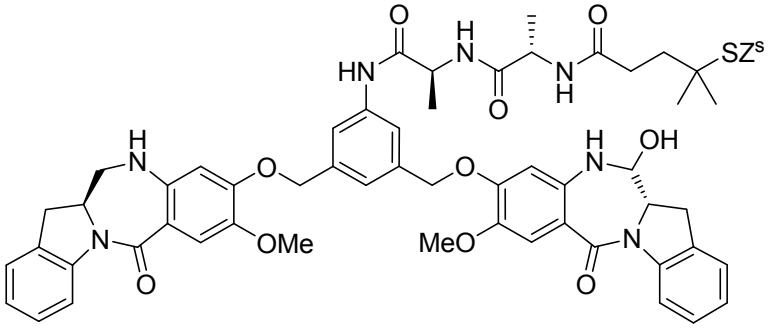
;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O

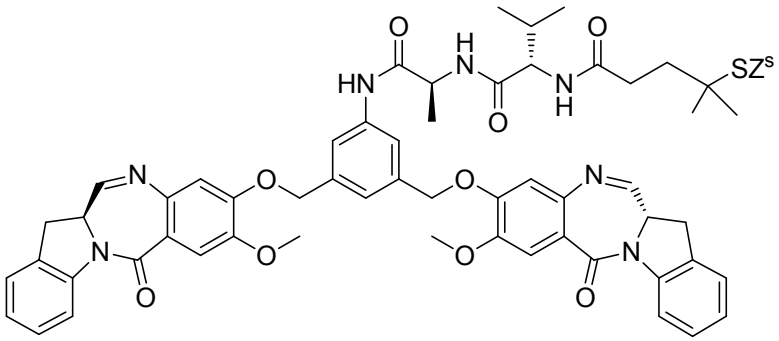
;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
O
O

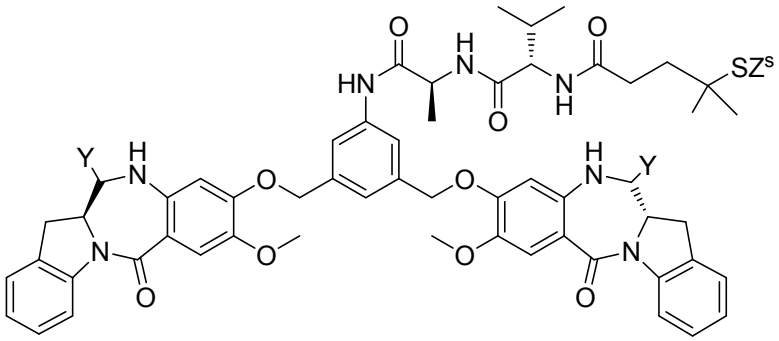
;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
O
O
N

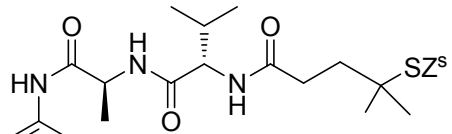
;

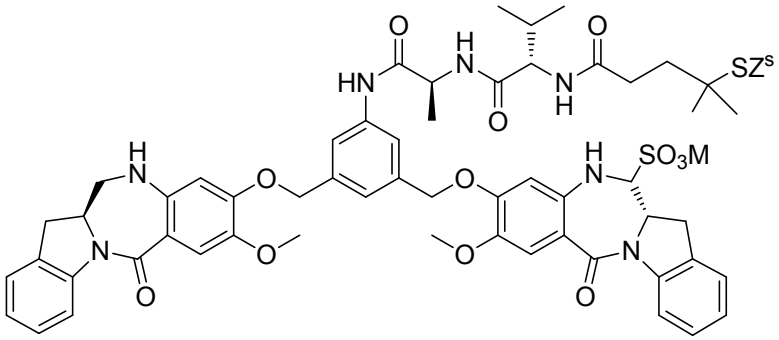

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
N
O
N
O
O
O
N

;

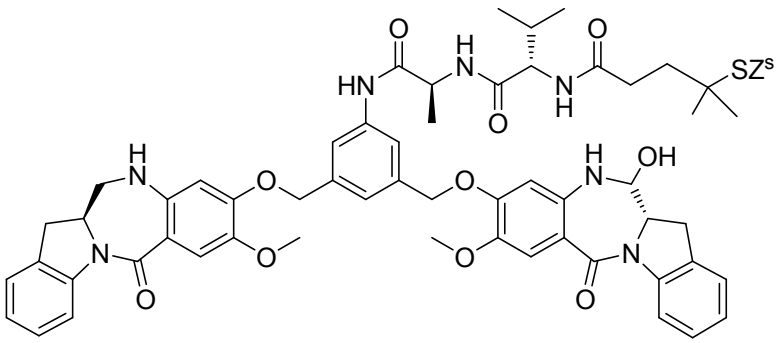

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
Y
H
N
O
H
N
Y
O
O
N

;

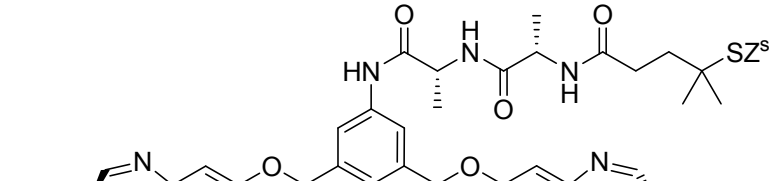

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O

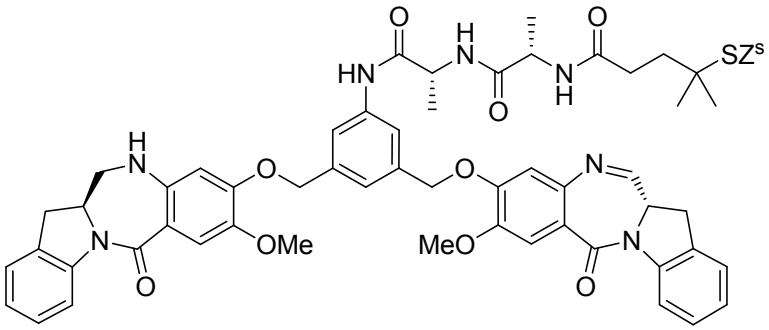

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
SO3M
O
O
N
O
O
N
O

;

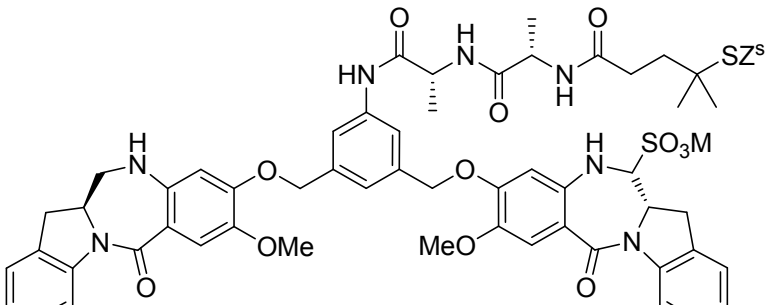

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
OH
O
O
N
O
O
N
O

;

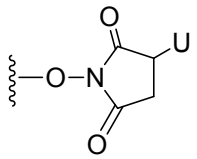

O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
N
O
O
N


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
O
N
OMe
MeO
N
O
O

;


O
H
N
O
HN
N
H
SZ^s
O
H
N
H
N
SO3M
O
O
OMe
MeO
N
O
O

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

R_{100} es –OH, –OMe o  ;

Y es –H, -OH o $-SO_3M$; y

M es un catión farmacéuticamente aceptable (p. ej., H^+, Na^+ o K^+);

Z^s es –H, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ o se selecciona de las fórmulas (a1')-(a15') descritas anteriormente.

En una modalidad específica, Z^s se selecciona de las fórmulas (a1)-(a15) descritas anteriormente.

En una modalidad más específica, Z^s se selecciona de las fórmulas (a7), (a8), (a9) y (a15). En una modalidad más específica, Z^s está representado por la fórmula (a9). Alternativamente, Z^s está representado por la fórmula (a7).

En otra modalidad específica, Z^s es –H.

En otra moda específica, Y es $-SO_3M$. Alternativamente, Y es –OH.

En la presente invención también se incluyen metabolitos de cualquier compuesto citotóxico o conjugados de agente de unión celular-agente citotóxico descritos en la presente.

SÍNTESIS DE COMPUESTOS CITOTÓXICOS

Los compuestos citotóxicos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en la patente estadounidense N.° 8.765.740 y la publicación de solicitud estadounidense N.° 2012/0238731.

En los ejemplos 1-10 se muestran procesos representativos para preparar los compuestos dímeros citotóxicos de la presente invención.

AGENTES DE UNIÓN CELULAR

La eficacia de los conjugados de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión celular adecuado. Los agentes de unión celular pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se conoce, incluso péptidos y no péptidos. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (por ejemplo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas (por ejemplo folato *etc.*, que se puede unir a un receptor de la superficie celular de estos, p. ej., un receptor de folato), moléculas transporte de nutrientes (por ejemplo transferrina), o cualquier otra sustancia o molécula de unión celular.

La selección del agente de unión celular adecuado es una cuestión de elección que depende parcialmente de la población celular específica que se tomará como diana, pero en muchos casos (aunque no en todos), los anticuerpos monoclonales humanos son una buena opción si hay alguno apropiado disponible. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un

anticuerpo IgG_1 murino que se une específicamente al antígeno CD33 (J.D. Griffin *et al.*, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984)) y se puede utilizar si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad leucemia mielógena aguda (AML).

En determinadas modalidades, el agente de unión celular no es una proteína. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el agente de unión celular puede ser una vitamina que se une a un receptor de vitaminas, como un receptor de superficie celular. En este sentido, la vitamina A se une a la proteína de unión a retinol (RBP) para formar un complejo, este complejo a su vez se une al receptor STRA6 con afinidad alta y aumenta la absorción de vitamina A. En otro ejemplo, el ácido fólico/folato/vitamina B_9 se une al receptor de folato de superficie celular (FR), por ejemplo, FRα, con afinidad alta. El ácido fólico o los anticuerpos que se unen a FRα se pueden utilizar para dirigirse al receptor de folato expresado en tumores de ovarios y de otro tipo. Además, la vitamina D y su análogo se unen al receptor de vitamina D.

En otras modalidades, el agente de unión celular es una proteína o un polipéptido, o un compuesto que comprende una

proteína o un polipéptido, incluido un anticuerpo, una proteína no anticuerpo o un polipéptido. Preferentemente, la proteína o polipéptidos comprenden uno o más residuos Lys con grupo $-NH_2$ de cadena lateral. Los grupos $-NH_2$ de cadena lateral de Lys se pueden unir por enlace covalente a los reticulantes bifuncionales que, a su vez, se unen a los compuestos dímeros de la invención, conjugando así los agentes de unión celular a los compuestos dímeros de la invención. Cada agente de unión celular basado en proteína puede contener múltiples grupos $-NH_2$ de cadena lateral de Lys disponibles para unirse a los compuestos de la invención a través de reticulantes bifuncionales.

En una modalidad, GM-CSF, un ligando/factor de crecimiento que se une a las células mieloides, como un agente de unión celular a células enfermas de leucemia mielógena aguda. La IL-2 que se une a células T activadas se puede usar para la prevención del rechazo de injertos en trasplantes, para la terapia y la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped y para el tratamiento de leucemia aguda de células T. Se pueden usar MSH, que se unen a melanocitos, para el tratamiento del

melanoma, así como anticuerpos dirigidos hacia melanomas. Se puede utilizar el factor de crecimiento epidérmico para dirigirse a cánceres escamosos, como el de pulmón y el de cabeza y cuello. Se puede utilizar la somatostatina para dirigirse a los neuroblastomas y otros tipos de tumores. Se puede utilizar el estrógeno (o análogos del estrógeno) para dirigirse al cáncer de mama. Se puede utilizar el andrógeno (o análogos del andrógeno) para dirigirse a los testículos.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular puede ser una linfocina, una hormona, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias o una molécula de transporte de nutrientes.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular es un mimético de anticuerpo, como una proteína de repetición de anquirina, una centirina o una adnectina/monocuerpo.

En otras modalidades, el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, un fragmento de anticuerpo monoclonal (o una "parte de

unión al antígeno”) que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico (o una “parte de unión al antígeno”) que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio (p. ej., sdAb) o un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado (o una “parte de unión al antígeno”). En una modalidad específica, el anticuerpo humanizado es huMy9-6 u otro anticuerpo relacionado, que se describe en las patentes estadounidenses N.° 7.342.110 y 7.557.189. En otra modalidad específica, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo del receptor anti-folato descrito en las solicitudes provisionales estadounidenses N.° 61/307.797, 61/346.595 y 61/413.172 y la solicitud estadounidense N.° 13/033.723 (publicada como US 2012/0009181 A1). Los principios de todas estas solicitudes se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular es un

anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena simple revestido o un fragmento de anticuerpo revestido (o una "parte de unión al antígeno") o un anticuerpo biespecífico.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular es un minicuerpo, un avibody, un diacuerpo, un tricuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un procuerpo, un anticuerpo de dominio o un unicuerpo.

En otras palabras, un agente de unión celular ejemplar puede incluir un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana, un interferón (p. ej., α, β, γ), una linfocina (p. ej., IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6), una hormona (p. ej., insulina, hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona estimulante de melanocitos (MSH) y

un hormona esteroide (p. ej., andrógeno y estrógeno)), una vitamina (p. ej., folato), un factor de crecimiento (p. ej., EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF), un factor estimulante de colonias, una molécula de transporte de nutrientes (p. ej., transferrina; véase O'Keefe *et al*. (1985) *J. Biol. Chem*. 260:932-937, que se incorpora a la presente mediante referencia), una centirina (un andamiaje de proteínas basado en una secuencia de consenso de repeticiones de fibronectina tipo III (FN3); véase la publicación de patente estadounidense 2010/0255056, 2010/0216708 y 2011/0274623 que se incorpora a la presente mediante referencia), una proteína de repetición de anquirina (p. ej., una proteína de repetición de anquirina diseñada, conocida como DARPin; véanse las publicaciones de patentes estadounidenses N.° 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146 y 2011/0224100, que se incorporan a la presente mediante referencia y, además, véase C. Zahnd et al., Cancer Res. (2010) 70:1595-1605; Zahnd et al., J. Biol. Chem. (2006) 281(46):35167-35175; y Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., Nature Biotechnology (2005) 23:1257-1268, que se incorporan a la presente mediante referencia), una proteína de

repeticiones tipo anquirina o un péptido sintético (véase, p. ej., la publicación de patente estadounidense N.° 2007/0238667; la patente estadounidense N.° 7.101.675; WO 2007/147213; y WO 2007/062466, que se incorporan a la presente mediante referencia), una adnectina (una proteína de andamiaje de dominio de fibronectina; véanse las publicaciones de patentes estadounidenses N.° 2007/0082365; 2008/0139791, que se incorporan a la presente mediante referencia), un avibody (incluidos los diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos; véanse las publicaciones estadounidenses N.° 2008/0152586 y 2012/0171115), moléculas de redireccionamiento receptoras dobles (DART) (P.A. Moore *et al.*, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, *et al.*, *Arthritis Rheum*, 30 de marzo de 2010; 62(7):1933-43; Johnson S, *et al. J Mol Biol,* 9 de abril de 2010;399(3):436-49), proteína supercargadas de penetración celular (*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012), y otras sustancias o moléculas de unión celular.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular puede ser un ligando que se une a un resto en la célula diana, como un receptor de superficie celular. Por ejemplo, el ligando

puede ser un factor de crecimiento o un fragmento de este que se une a un receptor del factor de crecimiento; o puede ser una citocina o un fragmento de esta que se une a un receptor de citocina. En determinadas modalidades, el receptor de factor de crecimiento o el receptor de citocina es un receptor de superficie celular.

En determinadas modalidades, cuando el agente de unión celular es un anticuerpo o una parte de unión al antígeno de este (incluido derivados de anticuerpo) o determinados miméticos de anticuerpo, el CBA se puede unir a un ligando en la célula diana, como un ligando de superficie celular, incluido los receptores de superficie celular.

Algunos antígenos o ligandos ejemplares específicos pueden incluir renina; una hormona de crecimiento (p. ej., la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina); un factor de liberación de hormona de crecimiento; una hormona paratiroidea; una hormona estimulante de la tiroides; una lipoproteína; alfa-1-antitripsina; insulina cadena A; insulina cadena B; proinsulina; una hormona estimulante del folículo; calcitonina; una hormona luteinizante; glucagón; un factor de

coagulación (p. ej., factor vmc, factor IX, factor de tejido y factor de von Willebrands); y un factor anticoagulante (p. ej., proteína C); un factor natriurético atrial; un tensioactivo pulmonar; un activador plasminógeno (p. ej., una urocinasa, orina humana o activador plasminógeno de tipo tisular); bombesina; una trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; una encefalinasa; RANTES (es decir, regulada al momento de la activación normalmente expresada y secretada por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófago humana-1-alfa; una albúmina sérica (albúmina sérica humana); sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; un péptido asociado con la gonadotropina de ratones; una proteína microbiana (beta-lactamasa); DNasa; IgE; un antígeno asociado con el linfocito T citotóxico (p. ej., CTLA-4); inhibina; activina; un factor de crecimiento endotelial vascular; un receptor para las hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; un factor reumatoide; un factor neurotrófico (p. ej., factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrofina-3, -4, -5 o -6), un factor de crecimiento de nervios (p. ej., NGF-β);

un factor de crecimiento derivado de plaquetas; un factor de crecimiento de fibroblastos (p. ej., aFGF y bFGF); un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2; un factor de crecimiento epidérmico; un factor de crecimiento de transformación (p. ej., TGF-alfa, TGF-β1, TGF- β2, TGF-β3, TGF-β4 y TGF-β5); factor de crecimiento de tipo insulina-I y -II; des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina; melanotransferrina; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; un receptor de EphA; un receptor de EphB; un receptor de folato; FOLR1; mesotelina; cripto; una $alfa_v beta_6$; integrinas; VEGF; VEGFR; EGFR; receptor de transferrina; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; proteínas CD (p. ej., CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD123, CD134, CD137, CD138 y CD152), uno o más antígenos asociados con tumores o receptores de superficie celular (véase la publicación estadounidense N.° 2008/0171040 o la publicación estadounidense N.° 2008/0305044, que se incorporan en su

totalidad mediante referencia); eritropoyetina; un factor osteoinductivo; una inmunotoxina; una proteína morfogénica ósea; un interferón (p. ej., interferón-alfa, -beta y -gamma); un factor estimulante de colonias (p. ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF); interleucinas (p. ej., IL-1 a IL-10); superóxido dismutasa; un receptor de células T; una proteína de membrana superficial; un factor de aceleración del deterioro; antígenos virales (p. ej., una parte de la envoltura del VIH); una proteína de transporte, un receptor de alojamiento; una adresina; una proteína reguladora; una integrina (p. ej., CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM) un antígeno asociado con tumores (p. ej., el receptor de HER2, HER3 y HER4); endoglina; c-Met; c-kit; 1GF1R; PSGR; NGEP; PSMA; PSCA; TMEFF2; LGR5; B7H4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Según se emplea en la presente, el término "**anticuerpo**" incluye moléculas de inmunoglobulina (Ig). En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, a saber dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC)

interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera, que está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Intercaladas con dichas regiones se encuentran las regiones marco más conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

En determinadas modalidades, el anticuerpo es IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. En determinadas modalidades, el anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; o IgA1 o IgA2.

En determinadas modalidades, el agente de unión celular es una "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo monoclonal que comparte las secuencias fundamentales para la unión al antígeno

con un anticuerpo (como huMy9-6 o sus anticuerpos relacionados descritos en las patentes estadounidenses N.° 7.342.110 y 7.557.189, que se incorporan a la presente mediante referencia).

Según se emplea en la presente, el término "**parte de unión al antígeno**" de un anticuerpo (o, a veces, se denomina indistintamente "fragmentos de anticuerpo") incluye uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que determinados fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión al antígeno de un anticuerpo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (entre otros): (i) un fragmento **Fab**, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 (p. ej., un anticuerpo digerido por papaína produce tres fragmentos: dos fragmentos Fab de unión al antígeno y un fragmento Fc que no se une al antígeno); (ii) un fragmento **$F(ab')_2$**, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra (p.

ej., un anticuerpo digerido por pepsina produce dos fragmentos: un fragmento $F(ab')_2$ de unión al antígeno bivalente y un fragmento pFc' que no se une al antígeno) y su unidad monovalente **F(ab')** relacionada; (iii) un fragmento **Fd** que consiste en los dominios VH y CH1 (es decir, la parte de la cadena pesada que está incluida en el Fab); (iv) un fragmento **Fv** que consiste en los dominios VL y VH de un grupo único de un anticuerpo y el **Fv unido por enlace disulfuro** relacionado; (v) un fragmento **dAb** (anticuerpo de dominio) **o sdAb** (anticuerpo de dominio simple) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (**CDR**) aislada. En determinadas modalidades, la parte de unión al antígeno es un **sdAb** (anticuerpo de dominio simple).

En determinadas modalidades, la parte de unión al antígeno también incluye determinados derivados modificados genéticamente o recombinantes (o "**anticuerpos derivados**") que también incluyen uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno además de elementos o secuencias que es posible que no se

encuentren en los anticuerpos de origen natural.

Por ejemplo, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir usando métodos recombinantes estándar mediante un enlazador sintético que permite convertirlos en una cadena proteica simple donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (**scFv**); véase, p. ej., Bird et al. Science 242:423-426, 1988: y Huston *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883, 1988).

En todas las modalidades descritas en la presente, el extremo N de un scFv puede ser un dominio VH (es decir, N-VH-VL-C) o un dominio VL (es decir, N-VL-VH-C).

Se pueden diseñar mediante modificación genética fragmentos variables de cadena simple divalentes (o bivalentes) (**di-scFv**, **bi-scFv**) a través de la unión de dos scFv. Esto produce una cadena peptídica única con dos regiones VH y dos regiones VL, lo que produce un scFv en tándem (**tascFv**). Se pueden producir de forma similar más repeticiones en tándem, como tri-scFv, mediante la unión de tres o más scFv de forma de cabeza a cola.

En determinadas modalidades, los scFv se pueden unir a través de péptidos enlazadores que son demasiado cortos (aproximadamente cinco aminoácidos) para que las dos regiones variables se plieguen juntas, lo que fuerza a los scFv a dimerizarse y formar **diacuerpos** (véase, p. ej., Holliger *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448, 1993; Poljak *et al*., Structure 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces menores que los scFv correspondientes, es decir, que tienen una afinidad mucho mayor a la diana.

Los enlazadores más cortos (uno o dos aminoácidos) provocan la formación de trímeros o los denominados **triacuerpos** o **tricuerpos**. También se han producido **tetracuerpos** de forma similar. Presentan una afinidad incluso mayor por sus dianas que los diacuerpos. Los diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos se denominan, a veces, colectivamente agentes de unión celular "**AVIBODY™**" (o "AVIBODY" para abreviar). Es decir, los AVIBODY que tienen dos, tres o cuatro regiones de unión a la diana (TBR) son conocidos como dia, tria y tetracuerpos. Véanse, por

ejemplo, las publicaciones estadounidenses N.° 2008/0152586 y 2012/0171115 para obtener detalles, cuyo contenido se incorpora por completo a la presente mediante esta referencia.

Todos estos formatos se pueden componer a partir de fragmentos variables con especificidad para dos o más antígenos diferentes y en dicho caso son tipos de anticuerpos bi o multiespecíficos. Por ejemplo, determinados di-scFv en tándem biespecíficos se conocen como captadores de linfocitos T biespecíficos (**BiTE**). En determinadas modalidades, cada scFv en el scFv en tándem o diacuerpo/triacuerpo/tetracuerpo puede tener la misma especificidad de unión o diferente, y cada uno puede tener, independientemente, un VH de extremo N o VL de extremo N.

Los Fv de cadena simple (scFv) también se pueden fusionar a un resto Fc, como el resto Fc de IgG humana para obtener propiedades similares a IgG, pero, no obstante, siguen estando codificados por un único gen. Como la producción transitoria de dichas proteínas **scFv-Fc** en los mamíferos puede lograr fácilmente cantidades de miligramos, este formato de anticuerpo derivado es particularmente adecuado para muchas aplicaciones de investigación.

Los **Fcab** son fragmentos de anticuerpo modificados genéticamente a partir de la región constante de Fc de un anticuerpo. Los Fcab se pueden expresar como proteínas solubles o se pueden modificar genéticamente para volver a ser un anticuerpo de longitud completa, como IgG, para crear **mAb2**. Un **mAb2** es un anticuerpo de longitud completa con un Fcab en lugar de la región Fc normal. Con estos sitios de unión adicionales, los anticuerpos monoclonales biespecíficos mAb2 se pueden unir a dos dianas diferentes al mismo tiempo.

En determinadas modalidades, los derivados de anticuerpo modificados genéticamente tienen un tamaño reducido de las proteínas recombinantes derivadas de Ig de unión al antígeno (mAb de tamaño completo "miniaturizados"), producidos mediante la remoción de los dominios que se consideran no esenciales para la función. Uno de los mejores ejemplos son los SMIP.

Un **componente inmunofarmacéutico de módulo pequeño** o **SMIP** es una proteína artificial fabricada principalmente a partir de partes de anticuerpos (inmunoglobulinas) y está diseñada para utilizar como un fármaco farmacéutico. Los SMIP tienen una semivida biológica similar a la de los anticuerpos, pero son

más pequeños que los anticuerpos y, por lo tanto, pueden tener mejores propiedades de penetración tisular. Los SMIP son proteínas de cadena simple que comprenden una región de unión, una región bisagra como un conector y un dominio efector. La región de unión comprende un fragmento variable de cadena simple (scFv) modificado y el resto de la proteína se puede construir a partir del Fc (como CH2 y CH3 como el dominio efector) y la región bisagra de un anticuerpo, como IgG1. Las células modificadas genéticamente producen SMIP como dímeros similares a anticuerpos que son aproximadamente 30 % más pequeños que los anticuerpos reales.

Otro ejemplo de dicho anticuerpo miniaturizado modificado genéticamente es un "**unicuerpo**", en el cual la región bisagra se ha retirado de las moléculas de IgG4. Las moléculas de IgG4 son inestables y pueden intercambiar heterodímeros de cadena ligera-pesada entre sí. La eliminación de la región bisagra evita completamente el emparejamiento cadena pesada-cadena pesada y deja heterodímeros de cadena pesada/ligera monovalentes altamente específicos, manteniendo a su vez la región Fc para garantizar la estabilidad y la semivida *in vivo*.

Un **anticuerpo de dominio simple** (**sdAb**, incluido, entre otros, los denominados **nanocuerpos** por Ablynx) es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Al igual que un anticuerpo completo, es capaz de unirse de forma selectiva a un antígeno específico, pero es mucho más pequeño debido a su peso molecular de solo 12-15 kDa. En determinadas modalidades, el anticuerpo de dominio simple se modifica genéticamente a partir de anticuerpos de cadena pesada (hcIgG). El primer sdAb se modificó genéticamente basándose en un hcIgG que se encuentra en los camélidos, denominado fragmentos V_HH. En determinadas modalidades, el anticuerpo de dominio simple se modifica genéticamente a partir de IgNAR ("receptor de antígenos nuevo de inmunoglobulina", véase abajo) utilizando un fragmento V_{NAR}. Los peces cartilaginosos (como los tiburones) tienen dichos anticuerpos IgNAR de cadena pesada. En determinadas modalidades, el sdAb se modifica genéticamente mediante la división de los dominios variables diméricos de la inmunoglobulina G común (IgG), como la de los seres humanos o los ratones, en los monómeros. En determinadas modalidades, un

nanocuerpo se deriva de un dominio variable de cadena pesada. En determinadas modalidades, un nanocuerpo se deriva de un dominio variable de cadena ligera. En determinadas modalidades, el sdAb se obtiene mediante el análisis de bibliotecas de secuencias de cadena pesada de dominio simple (p. ej., HC de dominio simple humana) para los aglutinantes para un antígeno diana.

Se derivan fragmentos de anticuerpo de dominio de receptor de antígenos nuevo variable simple (**V_{NAR}s** o dominios **V_{NAR}**) de anticuerpos de receptor de antígenos nuevo de inmunoglobulina (**IgNAR**) de peces cartilaginosos (p. ej., el tiburón). Al ser uno de los andamiajes de proteínas basados en inmunoglobulina conocidos más pequeños, dichas proteínas de dominio simple demuestran un tamaño y propiedades de reconocimiento de epítopo críptico favorables. Los anticuerpos IgNAR maduros consisten en homodímeros de un dominio de receptor de antígenos nuevo (V_{NAR}) y cinco dominios de receptor de antígenos nuevos constantes (C_{NAR}). Esta molécula es altamente estable y posee características de unión eficaces. Su estabilidad inherente se puede atribuir, probablemente, a (i) el andamiaje de Ig

subyacente, que presenta una cantidad considerable de residuos expuestos a superficies hidrofílicas y cargados en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en los anticuerpos murinos; y (ii) las características estructurales estabilizantes en los bucles de la región determinante de complementariedad (CDR) incluidos los puentes de disulfuro entre bucles y los patrones de los puentes de hidrógeno intrabucles.

Un **minicuerpo** es un fragmento de anticuerpo modificado genéticamente que comprende un scFv unido a un dominio CH, como el CH3γ1 (dominio CH3 de IgG1) o CH4ε (dominio CH4 de IgE). Por ejemplo, se ha vinculado un scFv específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) con el CH3γ1 para crear un minicuerpo, que antes se había demostrado que presentaba un direccionamiento tumoral excelente unido con depuración rápida *in vivo* (Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996). El scFv puede tener un VH o un VL de extremo N. La unión puede ser un péptido corto (p. ej., un enlazador de dos aminoácidos, como ValGlu) que produce un minicuerpo sin bisagra, no covalente. Alternativamente, la unión puede ser una bisagra IgG1 y un

péptido enlazador GlySer que produce un minicuerpo de bisagra, covalente.

Los anticuerpos naturales son monoespecíficos, pero bivalentes, en el hecho de que expresan dos dominios de unión al antígeno idénticos. Contrariamente, en determinadas modalidades, ciertos derivados de anticuerpos modificados genéticamente son moléculas bi o multiespecíficas que poseen dos o más dominios de unión al antígeno diferentes, cada uno con especificidad de diana diferente. Los anticuerpos biespecíficos se pueden generar mediante la fusión de dos células productoras de anticuerpos, cada una con especificidad distinta. Estos "cuadromas" produjeron múltiples especies moleculares porque las dos cadenas ligeras distintas y las dos cadenas pesadas distintas estaban libres para recombinarse en los cuadromas en configuraciones múltiples. Desde entonces, se han generado Fab biespecíficos, scFv y mAb de tamaño completo utilizando diversas tecnologías (véase arriba).

La proteína de inmunoglobulina de dominio variable doble (**DVD-Ig**) es un tipo de IgG específica doble que se direcciona simultáneamente a dos antígenos/epítopos (DiGiammarino *et al.*,

Methods Mol Biol. 899:145-56, 2012). La molécula contiene una región Fc y regiones constantes en una configuración similar a una IgG convencional. Sin embargo, la proteína DVD-Ig es única en el hecho de que cada grupo de la molécula contiene dos dominios variables (VD). Los VD dentro de un grupo están unidos en tándem y pueden poseer diferentes especificidades de unión. Las moléculas derivadas de anticuerpos triespecíficos también se pueden generar, por ejemplo, mediante la expresión de anticuerpos biespecíficos con dos Fab distintos y un Fc. Un ejemplo es un anti-Ep-CAM de IgG2a de ratón, cuadroma anti-CD3 de IgG2b de rata, denominado BiUII, que se cree que permite la colocalización de las células tumorales que expresan Ep-CAM, linfocitos T que expresan CD3 y macrófagos que expresan FCγRI, que potencian así las funciones coestimulante y antitumoral de las células inmunitarias.

Los **procuerpos** son anticuerpos monoclonales enmascarados, completamente recombinantes que permanecen inertes en el tejido sano, pero que se activan específicamente en el microambiente de enfermedad (p. ej., mediante la escisión de proteasa por una proteasa enriquecida o específica en un microambiente de

enfermedad). Véase Desnoyers *et al.*, *Sci Transl Med,* 5:207ra144, 2013. Se pueden utilizar técnicas de enmascaramiento similares para cualquiera de los anticuerpos o partes de unión al antígeno de estos descritos en la presente.

Un **intracuerpo** es un anticuerpo que se ha modificado para la localización intracelular, para trabajar dentro de la célula para unirse a un antígeno intracelular. El intracuerpo puede permanecer en el citoplasma o puede tener una señal de localización nuclear o puede tener una secuencia KDEL para el direccionamiento al ER. El intracuerpo puede ser un anticuerpo de cadena simple (scFv), dominios VL de inmunoglobulina modificada con hiperestabilidad, un anticuerpo seleccionado resistente al ambiente intracelular más reductor o expresado como una proteína de fusión con la proteína de unión a la maltosa u otras proteínas intracelulares estables. Dichas optimizaciones han mejorado la estabilidad y la estructura de los intracuerpos y pueden tener aplicabilidad general a cualquiera de los anticuerpos o partes de unión al antígeno de estos descritos en la presente.

Las partes de unión al antígeno o los anticuerpos derivados de

la invención pueden tener (1) regiones CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada; (2) regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada; o (3) regiones de cadena ligera y/o cadena pesada sustancialmente iguales o idénticas, en comparación con un anticuerpo a partir del cual se derivan/se modifican genéticamente. Las secuencias dentro de estas regiones pueden contener sustituciones de aminoácidos conservadoras, incluido sustituciones dentro de las regiones CDR. En determinadas modalidades, no hay más de 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras. En una alternativa, las partes de unión al antígeno o los anticuerpos derivados tienen una región de cadena ligera y/o una región de cadena pesada que son al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idénticas a un anticuerpo a partir del cual se derivan/modifican genéticamente. Estas partes de unión al antígeno o anticuerpos derivados pueden tener sustancialmente la misma especificidad de unión y/o afinidad por el antígeno diana en comparación con el anticuerpo. En determinadas modalidades, los valores de K_d y/o k_{off} de las partes de unión al antígeno o anticuerpos derivados se encuentran dentro de 10

veces (mayor o menor), 5 veces (mayor o menor), 3 veces (mayor o menor) o 2 veces (mayor o menor) que los de un anticuerpo descrito en la presente.

En determinadas modalidades, las partes de unión al antígeno o los anticuerpos derivados se pueden derivar/modificar genéticamente de anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos y se pueden producir de acuerdo con cualquier método reconocido en la técnica.

Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. En la técnica, se conocen particularmente los procedimientos para crear anticuerpos monoclonales producidos mediante la inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus completos, virus completos atenuados y proteínas virales como las proteínas de recubrimiento viral. También se pueden utilizar células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos

monoclonales es el uso de bibliotecas de fagos de scFv (región variable de cadena simple), específicamente scFv humano (véanse, p. ej., Griffiths *et al*., las patentes estadounidenses N.° 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty *et al*., WO 92/01047; Liming *et al*., WO 99/06587). Además, también se pueden utilizar los anticuerpos revestidos descritos en la patente estadounidense N.° 5.639.641, así como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados.

El agente de unión celular también puede ser péptidos derivados de la expresión en fagos (véase, por ejemplo, Wang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* (2011) 108(17), 6909-6914) o las técnicas de biblioteca de péptidos (véase, por ejemplo, Dane *et al., Mol. Cancer. Ther.* (2009) 8(5):1312-1318).

En determinadas modalidades, el CBA de la invención también incluye un mimético de anticuerpo, como un DARPin, un aficuerpo, una afilina, una afitina, una anticalina, un avímero, un fynomer, un péptido de dominio Kunitz, un monocuerpo o una nanofitina.

Según se emplean en la presente, los términos "**DARPin**" y "**proteína de repetición de anquirina (diseñada)**" se utilizan

indistintamente para hacer referencia a determinadas proteínas miméticas de anticuerpo modificadas genéticamente que típicamente presentan unión al a diana preferencial (a veces, específica). La diana puede ser una proteína, carbohidrato u otras entidades químicas y la afinidad de unión puede ser bastante alta. Las DARPin se pueden derivar de proteínas que contienen repeticiones de anquirina naturales y, preferentemente, consisten en al menos tres, generalmente, cuatro o cinco motivos de repetición de anquirina (por lo general aproximadamente 33 residuos en cada motivo de repetición de anquirina) de estas proteínas. En determinadas modalidades, una DARPin contiene aproximadamente cuatro o cinco repeticiones, y puede tener una masa molecular de aproximadamente 14 o 18 kDa, respectivamente. Se pueden generar bibliotecas de DARPin con residuos de interacción de diana potencial aleatorizada con diversidades de más de 10^{12} variantes a nivel del ADN para utilizar en la seleccionar de las DARPin que se unen a las dianas deseadas (p. ej., que actúan como agonistas o antagonistas del receptor, agonistas inversos, inhibidores de enzimas o aglutinantes de proteínas diana

simples) con especificidad y afinidad picomolar, utilizando diversas tecnologías como la expresión de ribosoma o la expresión en fagos de la partícula de reconocimiento de señales (SRP). Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses N.° 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146 y 2011/0224100, WO 02/20565 y WO 06/083275 para la preparación de DARPin (cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente mediante esta referencia) y véase también C. Zahnd *et al*. (2010) *Cancer Res.,* 70:1595-1605; Zahnd *et al*. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281(46):35167-35175; y Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:1257-1268 (que se incorporan a la presente mediante esta referencia). Véase también la publicación de patente estadounidense N.° 2007/0238667; la patente estadounidense N.° 7.101.675; WO 2007/147213; y WO 2007/062466 (cuyos contenidos se incorporan por completo a la presente mediante esta referencia), para el péptido sintético o las proteínas de repeticiones similares a la anquirina relacionados.

Las moléculas de **aficuerpo** son proteínas pequeñas modificadas genéticamente para unirse a una gran cantidad de proteínas o

péptidos diana con afinidad alta, imitando así a los anticuerpos monoclonales. Un aficuerpo consiste en tres hélices alfa con 58 aminoácidos y tiene una masa molar de aproximadamente 6 kDa. Se ha demostrado que soportan temperaturas altas (90 °C) o condiciones ácidas y alcalinas (pH 2,5 o pH 11) y se han obtenido aglutinantes con una afinidad que llega al intervalo subnanomolar de selecciones de bibliotecas sin tratamiento y se han obtenido aglutinantes con afinidad picomolar después de la maduración por afinidad. En determinadas modalidades, los aficuerpos se conjugan con electrófilos débiles para unirse a las dianas de forma covalente.

Los **monocuerpos** (también denominados **adnectinas**) son proteínas miméticas de anticuerpo modificadas genéticamente capaces de unirse a antígenos. En determinadas modalidades, los monocuerpos consisten en 94 aminoácidos y tienen una masa molecular de aproximadamente 10 kDa. Se basan en la estructura de la fibronectina humana, más específicamente en su décimo dominio tipo III extracelular, que tiene una estructura similar a los dominios variables de anticuerpo, con siete láminas beta

que forman un barril y tres bucles expuestos a cada lado correspondientes a las tres regiones determinantes de complementariedad. Los monocuerpos con especificidad para diferentes proteínas se pueden diseñar mediante la modificación de los bucles BC (entre la segunda y la tercera lámina beta) y FG (entre la sexta y la séptima lámina).

Un **tricuerpo** es un mimético de anticuerpo de autoensamblaje diseñado basándose en la región de hélice superenrollada de extremo C de la proteína de la matriz de cartílago (CMP) de ratón y humana, que se autoensambla en un complejo trimérico paralelo. Es un ligando de direccionamiento trimérico altamente estable creado mediante la fusión de un resto de unión a la diana específico con el dominio de trimerización derivado de CMP. Las proteínas de fusión resultantes se pueden autoensamblar de forma eficaz en un homotrímero paralelo bien definido con estabilidad alta. Los análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de los ligandos de direccionamiento triméricos demostraron una fuerza de unión a la diana significativamente mejorada en comparación con los monómeros correspondientes. Los estudios de unión celular confirmaron

que dichos tricuerpos tienen fuerza de unión superior hacia sus respectivos receptores.

Una **centirina** es otro mimético de anticuerpo que se puede obtener utilizando una biblioteca construida sobre el marco de una secuencia de dominio FN3 de consenso (Diem *et al.*, *Protein Eng Des. Sel.*, 2014). Esta biblioteca emplea posiciones diversificadas dentro de la cadena C, bucle CD, cadena F y bucle FG del dominio FN3 y se pueden seleccionar variantes de la centirina de afinidad alta contra las dianas específicas.

En una modalidad, el agente de unión celular es un anticuerpo del receptor anti-folato. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano (también conocido como receptor de folato alfa (FR-α)). Los términos "receptor 1 de folato humano", "FOLR1" o "receptor de folato alfa (FR-α)", tal como se usa en la presente, se refieren a cualquier FOLR1 humano natural, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, todos estos términos se pueden referir ya sea a una secuencia de ácido nucleico o proteína tal como

se indica en la presente. El término "FOLR1" comprende FOLR1 “de longitud completa” no procesado, así como también cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El anticuerpo FOLR1 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa_1FXaa_2Xaa_3 (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 5); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); en donde Xaa_1 se selecciona de K, Q, H y R; Xaa_2 se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa_3 se selecciona de G, E, T, S, A y V. Preferentemente, la secuencia CDR2 de cadena pesada comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFT**GYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYN**

QKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este codificado por el ADN de plásmido depositado con ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene números de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**G

VPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF

PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); o DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**G VPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al anticuerpo de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y la cadena ligera que tiene secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este codificado por el ADN de plásmido depositado con ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene números de depósito de ATCC PTA-

10772 y PTA-10773 o 10774.

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente el receptor 1 de folato humano y que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntico a QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11), y un dominio variable de cadena ligera al menos el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntico a DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12); o DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

En otra modalidad, el anticuerpo del receptor anti-folato es huMov19 o M9346A (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 8.709.432, la patente estadounidense N.° 8.557.966 y WO2011106528, todas incorporadas a la presente mediante esta

referencia).

En otra modalidad, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592, que se incorpora a la presente mediante referencia. En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado o EGFR-8. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Tal como se utiliza en la presente, las secuencias con doble subrayado representan las regiones variables (es decir, región variable de cadena pesada o HCVR, y región variable de cadena ligera o LCVR) de las secuencias de cadena pesada o ligera, mientras que las secuencias en negrita representan las regiones CDR (es decir, de extremo N a extremo C, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de cadena pesada o cadena ligera).

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada/ligera de longitud completa
huML66HC	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGLSL**ASNSVS**WIRQPPGKGLEWMG**VIWNHG** **GTDYNPSIKS**RLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVR**KGGIYFDY**WGQGV LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG (SEQ ID NO:14)
huML66LC	DTVLTQSPSLAVSPGERATISC**RASESVSTLMH**WYQQKPGQQPKLLIY**LASHRES**G VPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYC**QQSRNDPWT**FGQGTKLELKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, y preferentemente se une específicamente a EGFR.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 14, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15, y preferentemente que se une específicamente a EGFR.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR son los anticuerpos

descritos en 8.790.649 y WO 2012/058588, incorporados a la presente mediante esta referencia. En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es anticuerpo huEGFR-7R.

En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTF**TSYWMQ**WVKQRPGQGLECIG**TIYPGDGDTT**YT
QKFQGKATLTADKSSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCAR**YDAPGYAMDY**WGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:16) y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINNYLA**WYQHKPGKGPKLLIH**YTSTLHP**GIPSR
FSGSGSGRDYSFSISSLEPEDIATYYC**LQYDNLLYT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17), o una región

de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDINNYLA**WYQHKPGKGPKLLIH**YTSTLHP**GIPSR FSGSGSGRDYSFSISSLEPEDIATYYC**LQYDNLLYT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18).

En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:16 y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:17.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:16 y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:18.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 17 o 18, y preferentemente se une específicamente a EGFR.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 16, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o 18, y preferentemente que se une específicamente a EGFR.

En otra modalidad, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD19, por ejemplos los descritos en la patente estadounidense N.° 8.435.528 y WO2004/103272, incorporadas a la presente mediante esta referencia. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD19 comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFT**SNWMH**WVKQAPGQGLEWIG**EIDPSDSYTN**YN QNFQGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCAR**GSNPYYYAMDY**WGQGTSVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19) y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

EIVLTQSPAIMSASPGERVTMTC**SASSGVNYMH**WYQQKPGTSPRRWIY**DTSKLAS**GVPARF SGSGSGTDYSLTISSMEPEDAATYYC**HQRGSYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20).

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD19 es anticuerpo huB4.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD19 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 19, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, y preferentemente se une específicamente a CD19.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD19 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 19, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 20, y preferentemente que se une específicamente a CD19.

En aun otra modalidad, el agente de unión celular es un

anticuerpo anti-Muc1, por ejemplo los descritos en la patente estadounidense N.° 7.834.155, WO 2005/009369 y WO 2007/024222, incorporadas a la presente mediante esta referencia. En una modalidad, el anticuerpo anti-Muc1 comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGQGLEWIG**YIYPGNGATNYN**

QKFQGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCAR**GDSVPFAY**WGQGTLVTVSAASTKG

PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS

SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV

LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:21) y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

EIVLTQSPATMSASPGERVTITC**SAHSSVSFMH**WFQQKPGTSPKLWIY**STSSLAS**GVPARF

GGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQRSSFPLT**FGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE

QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA

DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22).

En otra modalidad, el anticuerpo anti-Muc1 es anticuerpo huDS6. En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-Muc1 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 21, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22, y preferentemente se une específicamente a Muc1.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-Muc1 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 21, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 22, y preferentemente que se une específicamente a Muc1.

En otra modalidad, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de este, por ejemplo los anticuerpos o fragmentos de estos descritos en las patentes estadounidenses N.° 7.557.189, 7.342.110, 8.119.787, 8.337.855 y WO2004/043344, incorporadas a la presente mediante esta referencia. En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD33 es anticuerpo huMy9-6.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD33 comprende una región

de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYN**

QKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL

SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS

VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:23) y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYL**AWYQQIPGQSPRLLIY**WASTRE**

SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST

LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:24).

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD33 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24, y preferentemente se une específicamente a CD33.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 23, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 24, y preferentemente que se une específicamente a CD33.

En otra modalidad, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD37 o fragmento de anticuerpo de este, por ejemplo los descritos en la patente estadounidense N.° 8.765.917 y WO 2011/112978, incorporadas a la presente mediante esta referencia. En una modalidad, el anticuerpo anti-CD37 es anticuerpo huCD37-3.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITC**RASENIRSNLA**WYQQKPGKSPKLLVN**VATNLAD**GVPSR FSGSGSGTDYSLKINSLQPEDFGTYYC**QHYWGTTWT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25) y una región de

cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLT**TSGVS**WVRQPPGKGLEWLG**VIWGDGSTN**YHP

SLKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAK**GGYSLAH**WGQGTLVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26), o una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLT**TSGVS**WVRQPPGKGLEWLG**VIWGDGSTN**YHS

SLKSRLSIKKDHSKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAK**GGYSLAH**WGQGTLVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:27)

En otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región

de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:25 y una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:26.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:25 y una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:27.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 26 o 27, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 25, y preferentemente se une específicamente a CD37.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 26 o 27, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 25, y preferentemente que se une específicamente a CD37.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de EIVLTQSPATMSASPGERVTMTC**SATSSVTYMH**WYQQKPGQSPKRWIY**DTSNLPY**GVPARF SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC**QQWSDNPPT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28) y una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de QVQLQESGPGLLKPSQSLSLTCTVSGYSIT**SGFAWH**WIRQHPGNKLEWMG**YILYSGSTV**YS PSLKSRISITRDTSKNHFFLQLNSVTAADTATYYCAR**GYYGYGAWFAY**WGQGTLVTVSAAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:29).

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 29, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 28, y preferentemente se une

específicamente a CD37.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 29, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 28, y preferentemente que se une específicamente a CD37.

En aun otra modalidad, el anticuerpo anti-CD37 es anticuerpo huCD37-50.

CONJUGADOS DE AGENTE DE UNIÓN CELULAR-FÁRMACO

La presente invención también proporciona conjugados de agente de unión celular-fármaco que comprenden un agente de unión celular unido a uno o más compuestos citotóxicos de la presente invención a través de diversos enlazadores, incluido, entre otros, enlazadores disulfuro, enlazadores de tioéter, enlazadores con enlace amida, enlazadores lábiles a peptidasa, enlazadores lábiles a ácido, enlazadores lábiles a esterasa.

En una segunda modalidad, la invención proporciona un conjugado que comprende: un compuesto citotóxico y un agente de unión

celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico está unido por enlace covalente al CBA, y en donde el compuesto citotóxico está representado por las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') o (VI'), en done las variables son como se describió arriba.

En determinadas modalidades, el compuesto citotóxico está representado por la fórmula estructural (I') o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

En determinadas modalidades, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), uno de L', L" y L'" está representado por la fórmula (A'):

$$-Z_1-P-Z_2-R_x-J' \qquad (A'),$$

y los otros son –H, un alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono, halógeno, -OH, (C_1-C_6)alcoxi o $-NO_2$. Específicamente, uno de L', L" y L'" está representado por la fórmula (A') y los otros son –H.

En una 1ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), L' está representado por la fórmula (A) y tanto L" como L"' son –H; y las variables restantes se describieron anteriormente en la primera

modalidad.

En una 2ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), R_x es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 6 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH, (C_1-C_3)alquilo, (C_1-C_3)alcoxi, halo(C_1-C_3)alquilo, o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad de la 1ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, Q es i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$ o $-Z'-NR_{11}R_{12}$, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; o ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ o $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' es un alquileno opcionalmente sustituido, un cicloalquileno opcionalmente sustituido o un fenileno opcionalmente sustituido; R_{14} a R_{16} son cada uno independientemente un alquilo opcionalmente sustituido; y X^- es un anión farmacéuticamente aceptable; y las variables restantes son como se describió arriba en la 2ª modalidad específica. Más específicamente, Q es $-SO_3H$ o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En una 3ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), J' comprende un resto que está unidos por enlace covalente al CBA y es $-NR^{c1}$ o -C(=O)-, en donde R^{c1} es -H o alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH o (C_1-C_3)alcoxi; y las variables restantes son como describió arriba en la primera modalidad o la 1ª o 2ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, J' es –C(=O)-; y las variables restantes son como se describió arriba en la 3ª modalidad específica.

En una 4ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), L' está representado por la siguiente fórmula:

$$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J' \quad (B1');$$

$$-NR_5-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J' \quad (B2');$$

$$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-J' \quad (C1'); \text{ o}$$

$$-C(=O)-P-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J' \quad (C2'),$$

en donde:

J' es –C(=O)-;

R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente -H, (C_1-C_3)alquilo o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q;

m es un entero entre 1 y 6;

m' es 0 o un entero entre 1 y 6; y

Cy es un alquilo cíclico que tiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH, (C_1-C_3)alquilo, (C_1-C_3)alcoxi o halo(C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª o 3ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, ambos R_a y R_b son H; Cy para las fórmulas (B2') y (C2') es ciclohexano; y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió arriba en la 4ª modalidad específica. Más específicamente, m' en las fórmulas (B2') y (C2') es 0 o 1.

En una 5ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), L' está representado por la siguiente fórmula:

$$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1} \qquad (B3'); \text{ o}$$

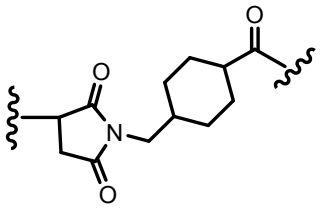
$$-C(=O)-P-NR_5-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1} \qquad (C3'),$$

en donde:

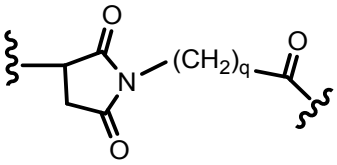
R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente –H, (C_1-C_3)alquilo o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q;

m es un entero entre 1 y 6;

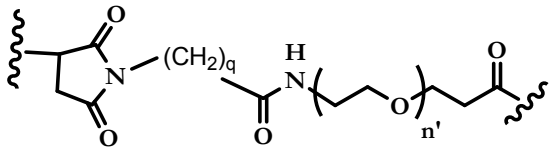
Z^{s1} se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:



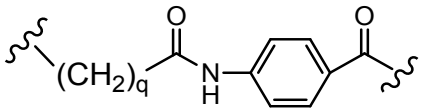
(b1);



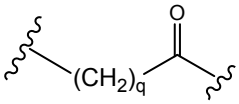
(b2);



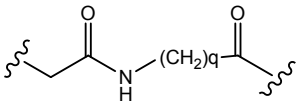
(b3);



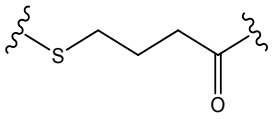
(b4);



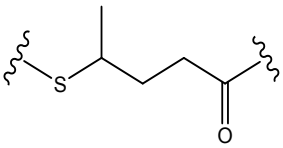
(b5);



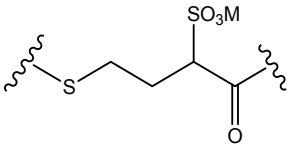
(b6);



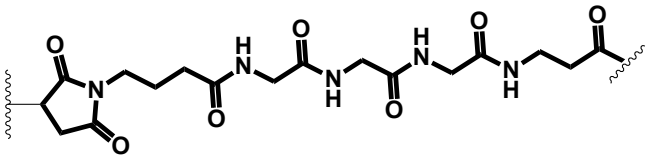
(b7);



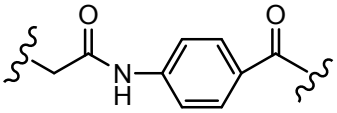
(b8);



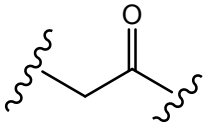
(b9);



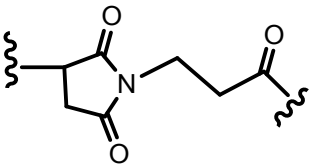
(b10);



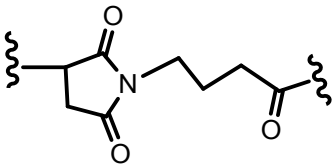
(b11);



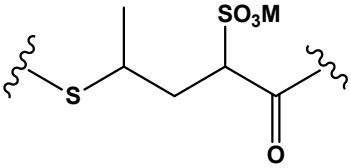
(b12);



(b13);



(b14) y



(b15),

en donde:

q es un entero entre 1 y 5;

n' es un entero de 2 a 6;

U es –H o SO_3M;

M es un catión farmacéuticamente aceptable (p. ej., H^+, Na^+ o K^+); y las variables restantes son como describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª o 4ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, el sustituyente cargado o un grupo ionizable Q es i) $-SO_3H$, $-Z'-SO_3H$, $-OPO_3H_2$, $-Z'-OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$, $-Z'-PO_3H_2$, $-CO_2H$, $-Z'-CO_2H$, $-NR_{11}R_{12}$ o $-Z'-NR_{11}R_{12}$, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; o ii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ o $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' es un alquileno opcionalmente sustituido, un cicloalquileno opcionalmente sustituido o un fenileno opcionalmente sustituido; R_{14} a R_{16} son cada uno independientemente un alquilo opcionalmente sustituido; y X^- es un anión farmacéuticamente aceptable; y las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica. Más específicamente, Q es $-SO_3H$ o una sal

farmacéuticamente aceptable de este.

En determinadas modalidades, ambos R_a y R_b son –H y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, $-(CR_aR_b)_m-$ es $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ y m" es un entero entre 1 y 5; las variables restantes son como se describió arriba en la 5ª modalidad específica.

En una 6ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), P es un péptido que contiene entre 2 y 10 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª o 5ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P es un péptido que contiene entre 2 y 5 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosil-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-

Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, P es Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala y D-Ala-D-Ala; y las variables restantes son como se describió arriba en la 6ª modalidad específica.

En una 7ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace doble; y las variables restantes son como se describió arriba en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª o 6ª modalidad específica.

En una 8ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple, X es –H o grupo protector amina; e Y se selecciona de -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R", un heterociclo que contiene nitrógeno de 5 o 6 miembros

opcionalmente sustituido, $-SO_3H$, $-SO_2H$ y $-OSO_3H$; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª o 7ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, Y se selecciona de -H, $-SO_3M$, -OH, -OMe, -OEt o –NHOH, en donde M es –H, Na^+ o K^+; y las variables restantes son como se describió arriba en la 8ª modalidad específica. Más específicamente, Y es -H, $-SO_3M$ o –OH.

En una 9ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'),, X' se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, y fenilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª o 8ª modalidad específica.

En determinadas modalidades, X' es –H, -OH, (C_1-C_3)alquilo, halo(C_1-C_3)alquilo o fenilo; y las variables restantes son como se describió arriba en la 9ª modalidad específica. Más específicamente, X' es -H, -OH o –Me. Incluso más

específicamente, X’ es -H.

En una 10ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I’), (II’), (III’), (IV’), (V’) y (VI’), Y’ es -H, un grupo oxo, (C_1-C_3)alquilo o halo(C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª o 9ª modalidad específica. Más específicamente, Y’ es -H u oxo. Incluso más específicamente, Y’ es –H.

En una 11ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I’), (II’), (III’), (IV’), (V’) y (VI’), A y A’ son el mismo o diferente, y se seleccionan de -O-, -S-, -NR_5- y oxo -(C=O)-; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª o 10ª modalidad específica. Más específicamente, A y A’ son los mismos o diferentes y se seleccionan de -O- y -S-. Incluso más específicamente, A y A’ son –O-.

En una 12ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I’), (II’), (III’), (IV’), (V’) y (VI’), R_6 es –OMe; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª ,

10ª o 11ª modalidad específica.

En una 13ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'),, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son independientemente –H, halógeno, $-NO_2$, -OH, (C_1-C_3)alquilo, halo(C_1-C_3)alquilo o (C_1-C_3)alcoxi; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª o 12ª modalidad específica. Más específicamente, R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son todos –H.

En una 14ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), R, R', R" y R_5 son cada uno independientemente –H o (C_1-C_3)alquilo; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 10ª, 11ª, 12ª o 13ª modalidad específica.

En una 14ª modalidad específica, para las fórmulas estructurales (I'), (II'), (III'), (IV'), (V') y (VI'), la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple o enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble X está ausente e Y es –H, y cuando es un enlace simple, X es –H, Y es

–OH o $-SO_3M$;

R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3' y R_4' son todos -H;

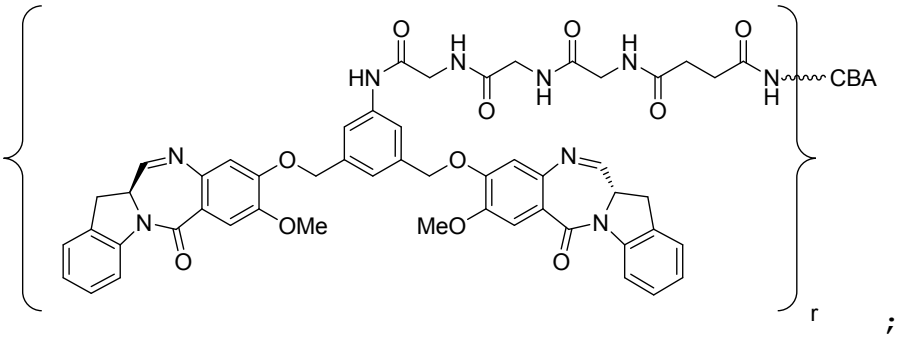
R_6 es -OMe;

X' e Y' son -H;

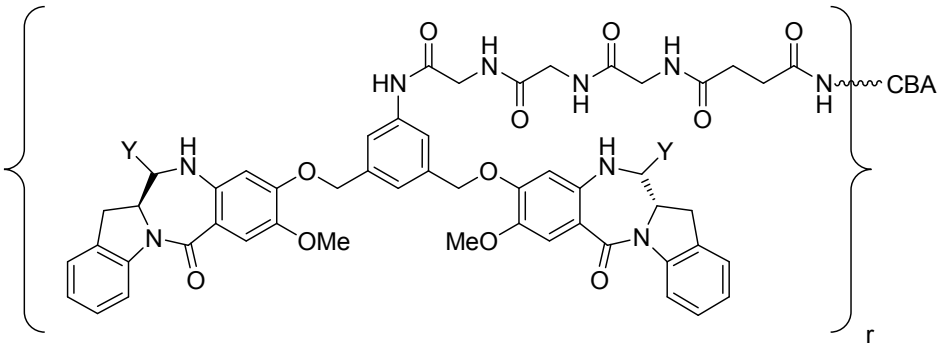
A y A' son -O-;

M es H, Na^+ o K^+; y las variables restantes son como se describió en la primera modalidad o la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª o 6ª modalidad específica.

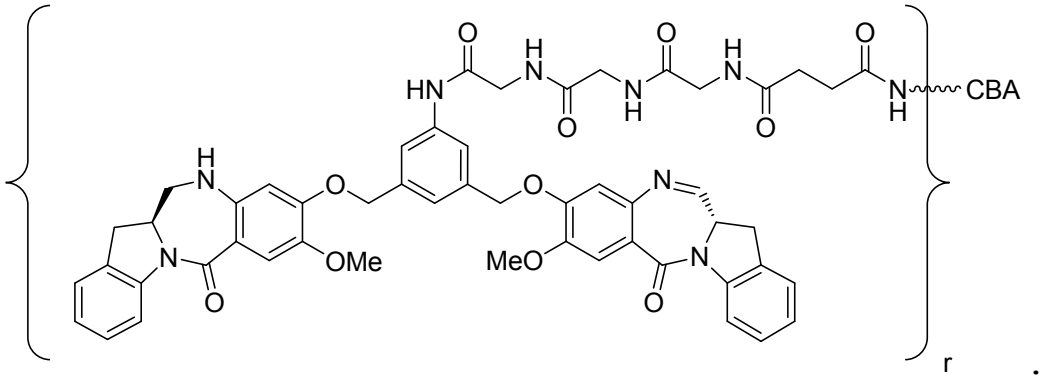
En una 15ª modalidad específica, el conjugado de la presente invención está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:



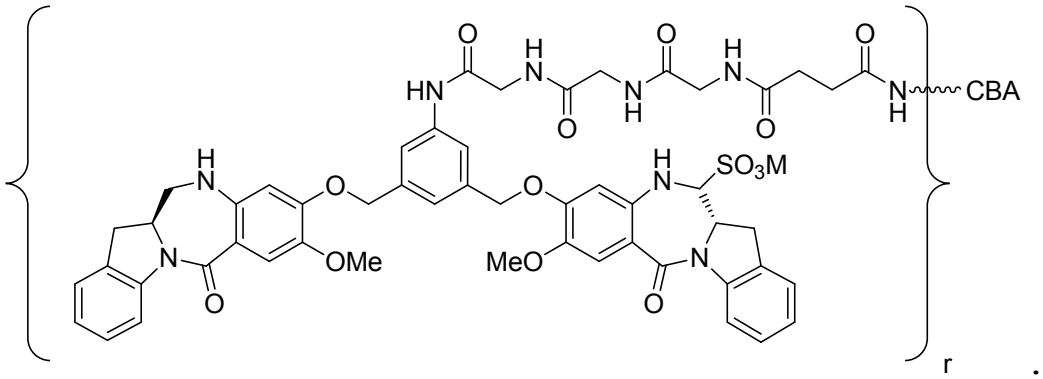
;



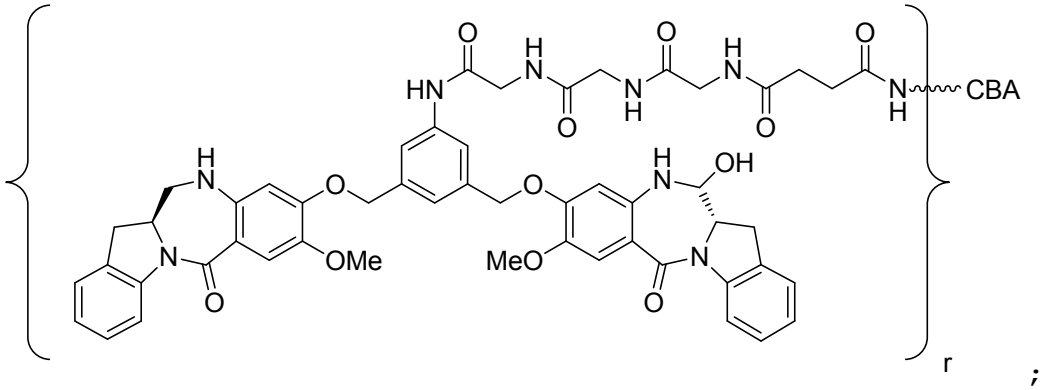
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
CBA
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

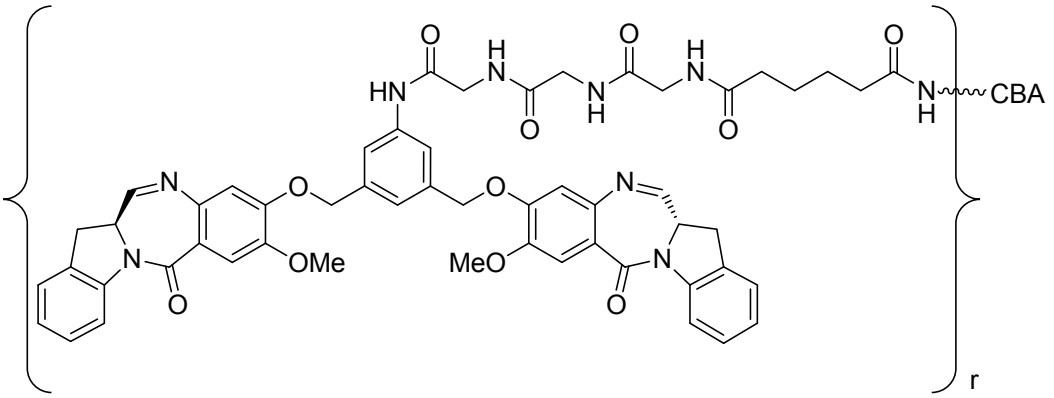
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

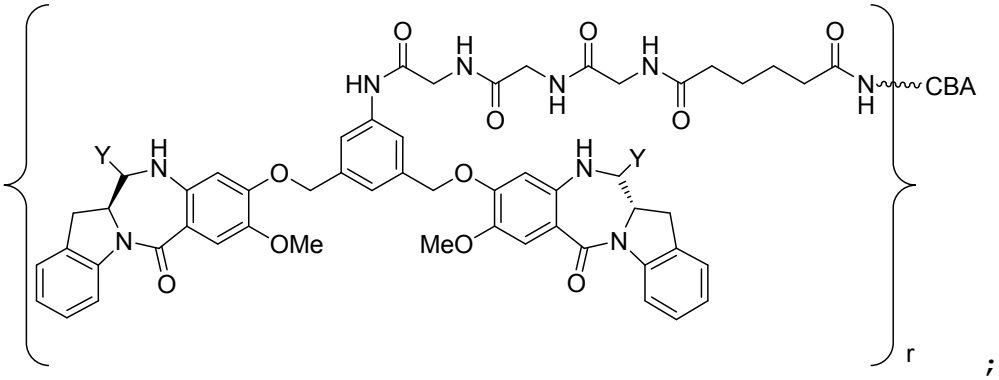
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

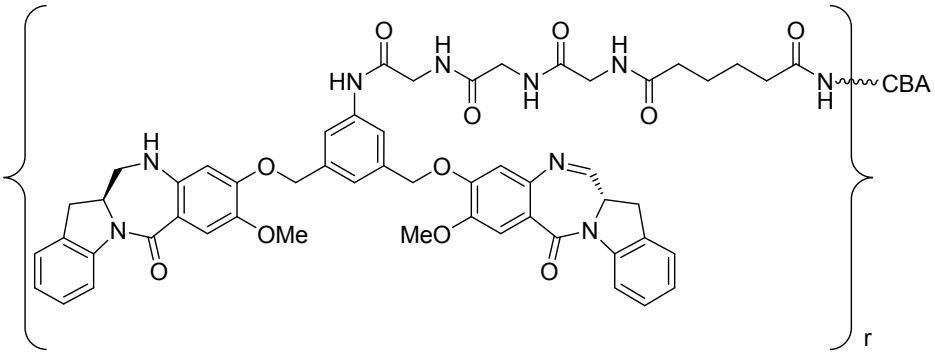
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
N
H
CBA
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

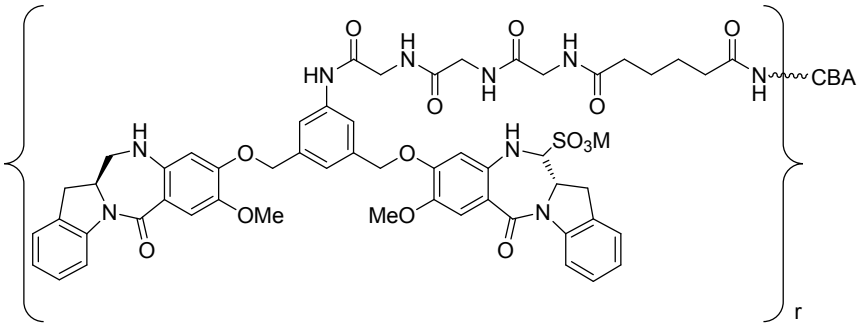
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
N
H
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

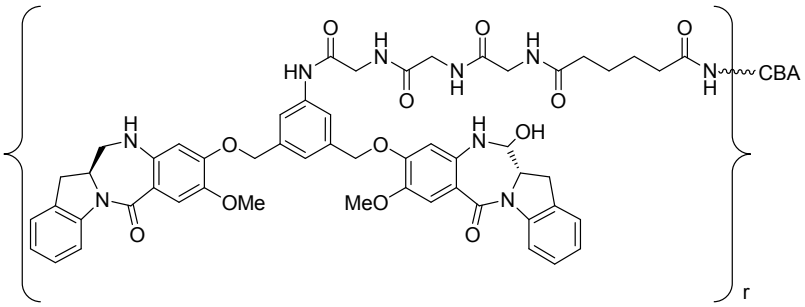
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
N
H
CBA
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

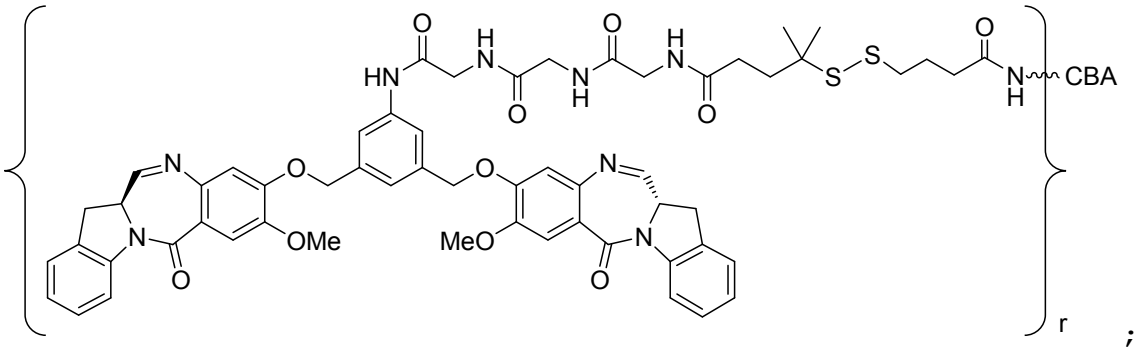
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
OMe
MeO
N
O
O
r

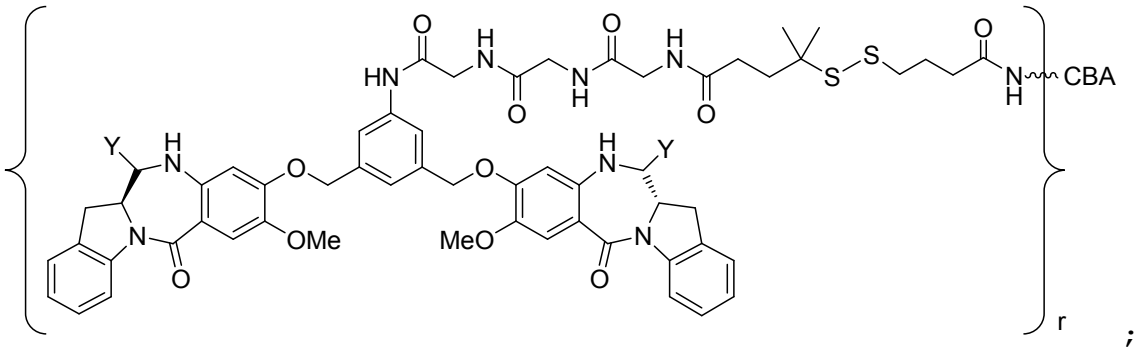
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
OMe
MeO
N
O
O
r

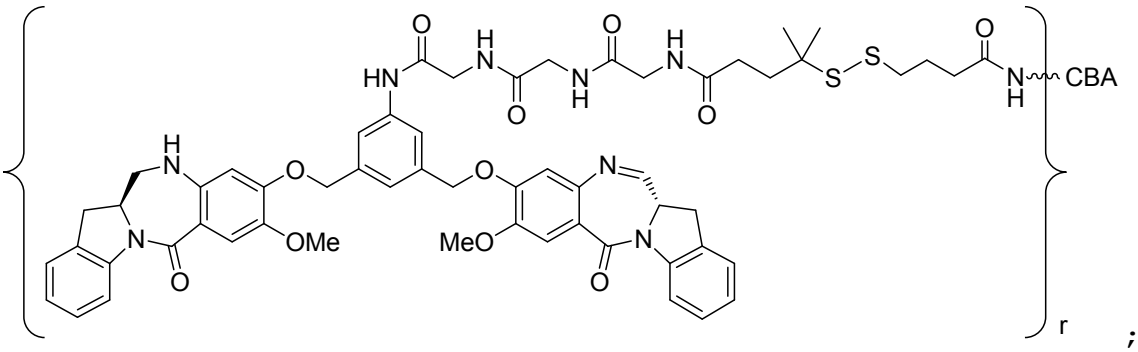
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

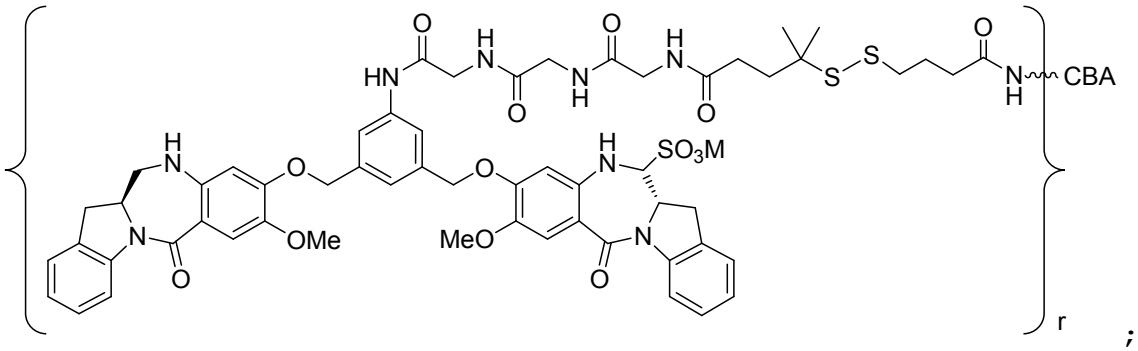
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

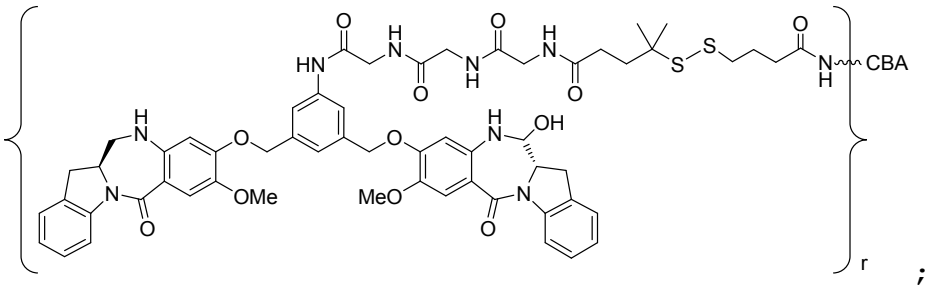
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

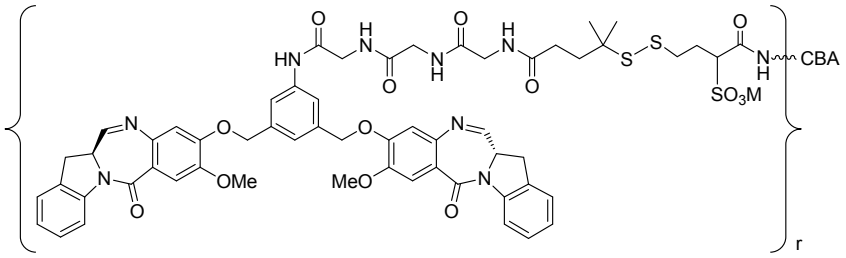
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

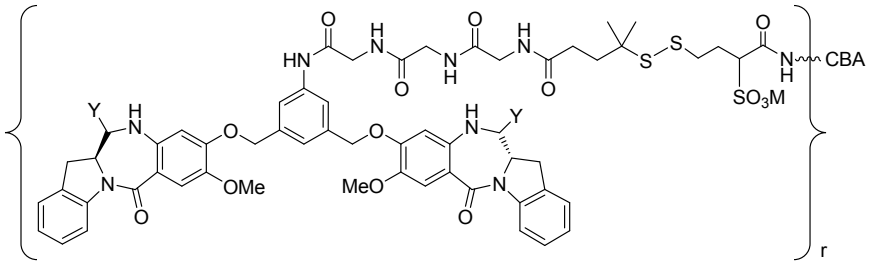
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
H
N
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
OMe
MeO
N
O
O
N
r

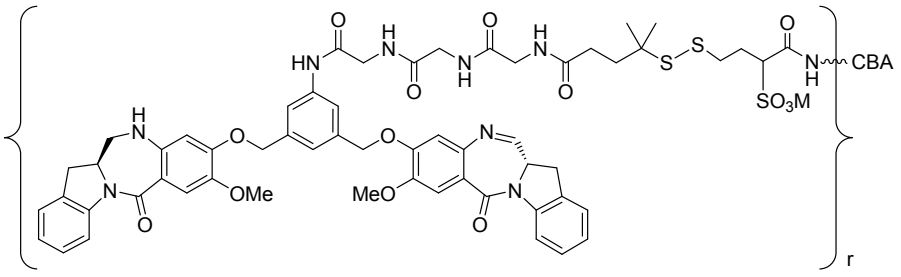
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
H
N
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

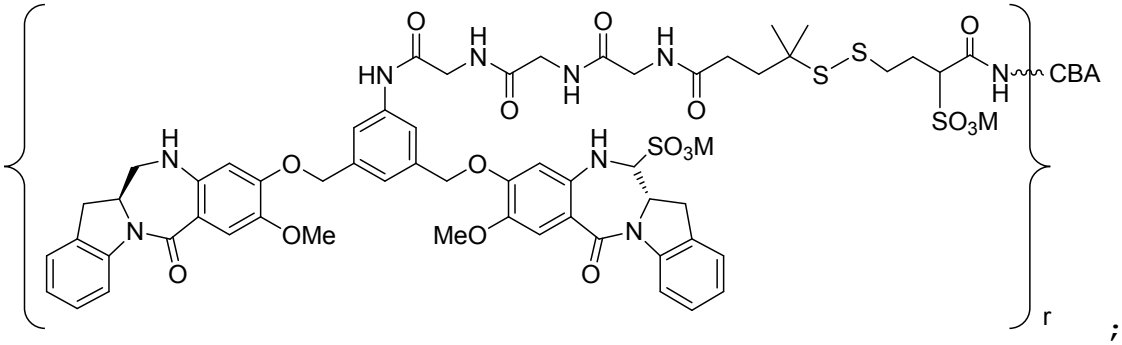
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
H
N
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
Y
H
N
O
O
H
N
Y
OMe
MeO
N
O
O
N
r

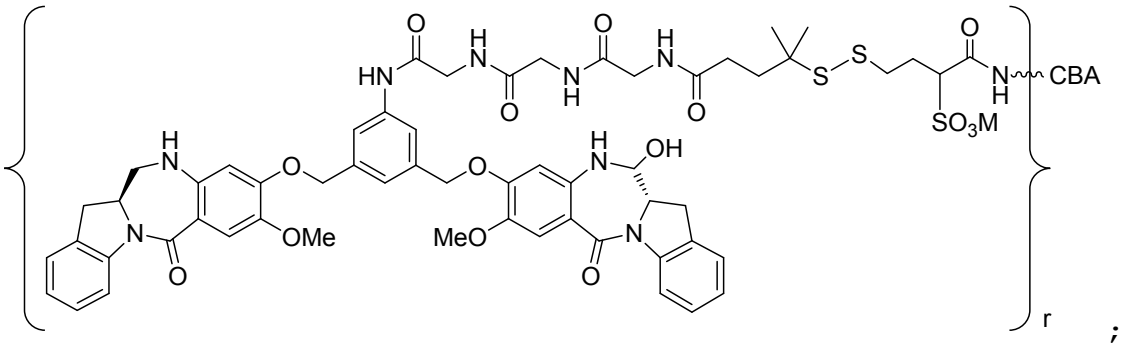
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
H
N
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

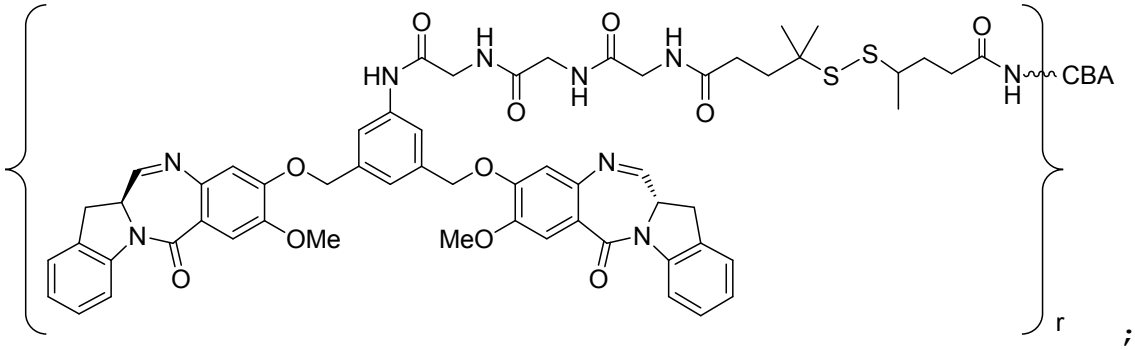
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

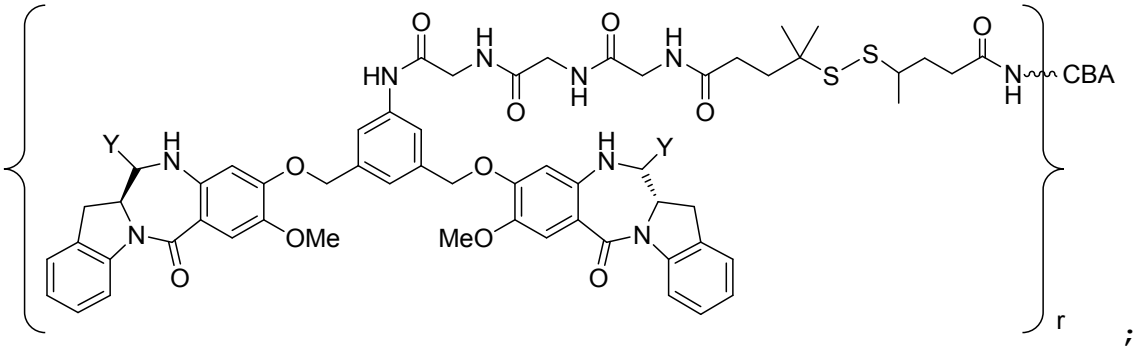
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

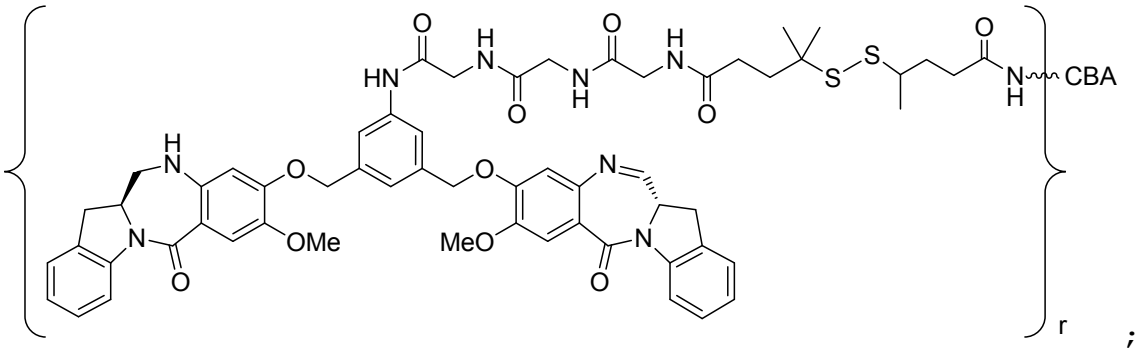
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

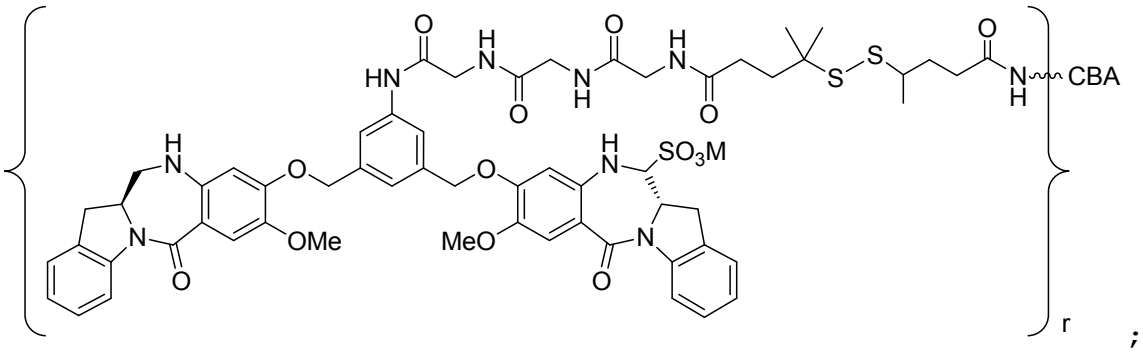
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

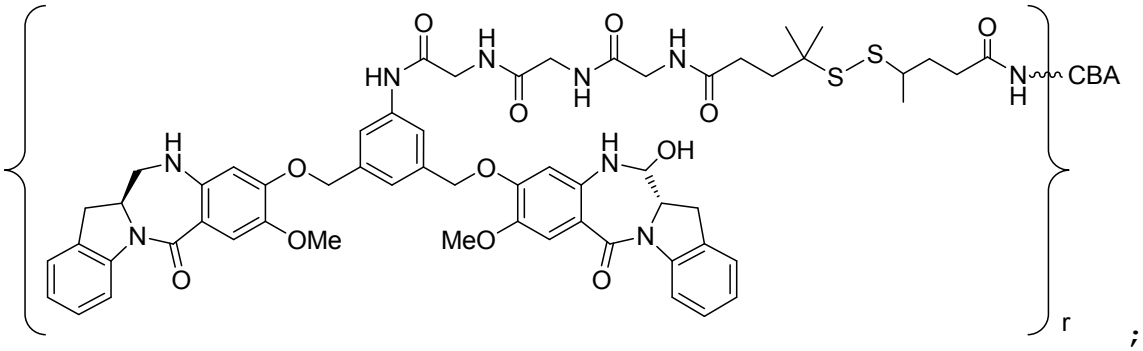
;


CBA
OMe
MeO
r

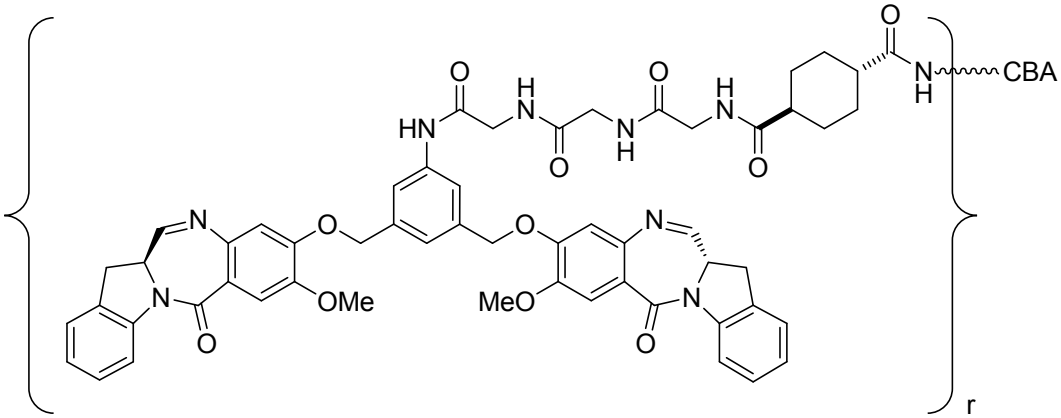
;


CBA
SO3M
OMe
MeO
r

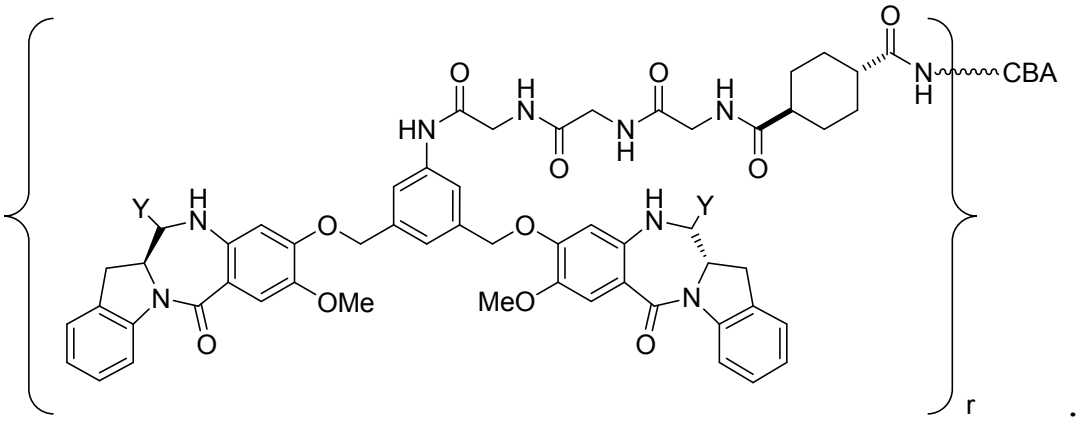
;


CBA
OH
OMe
MeO
r

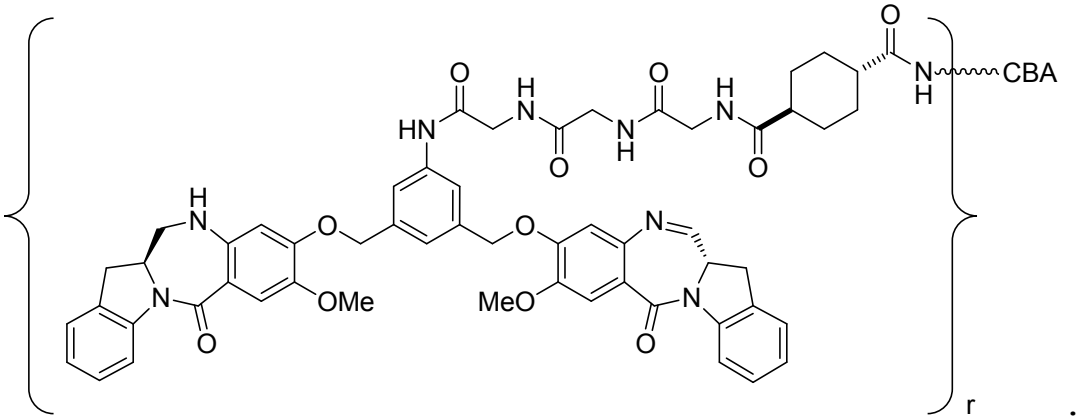
;


CBA
OMe
MeO
r

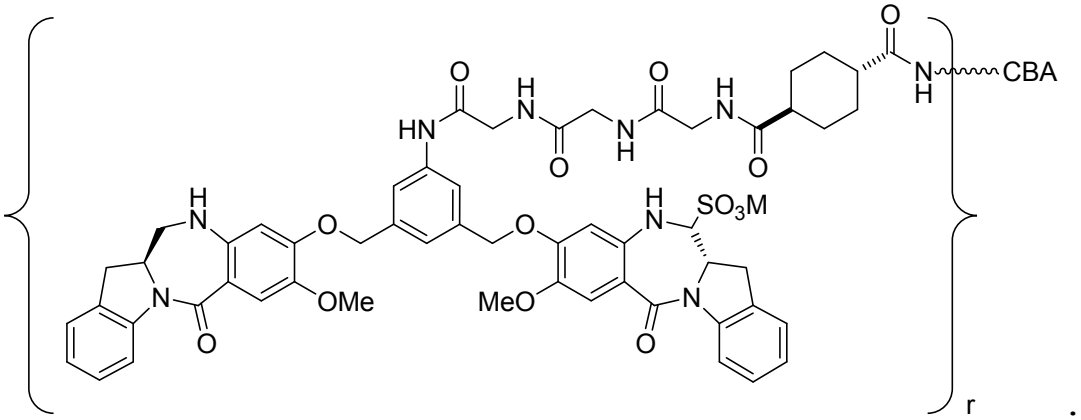
;


CBA
r

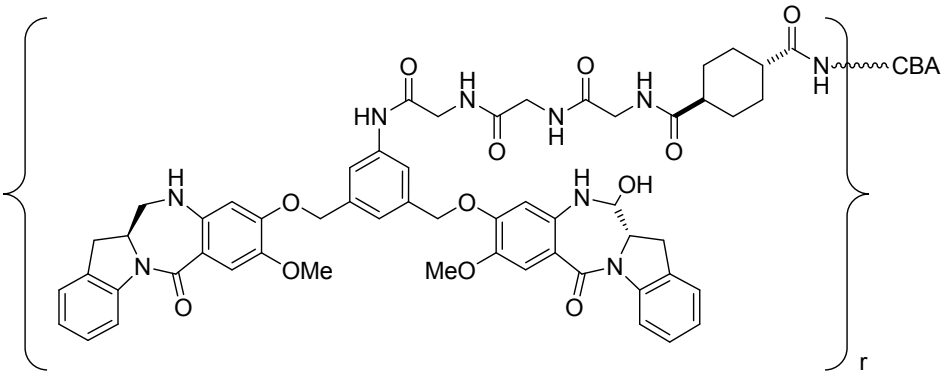
;


CBA
r

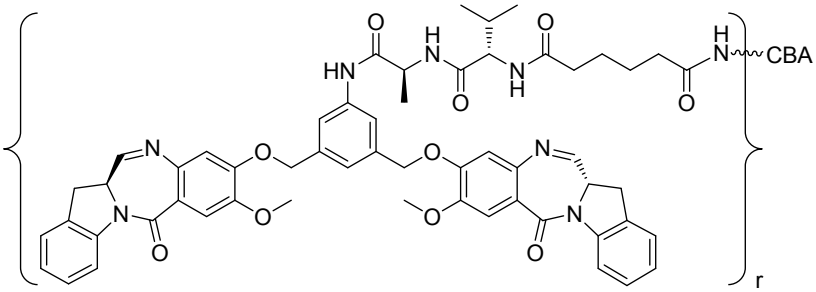
;


CBA
r

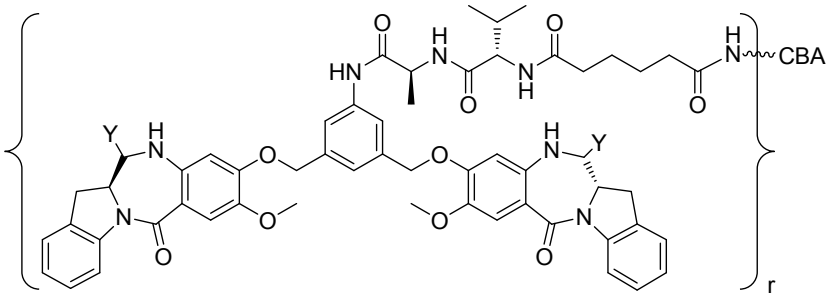
;


CBA
OMe
MeO
OH
r

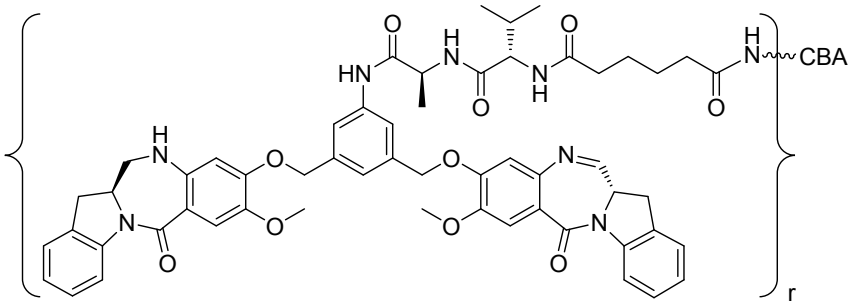
;


CBA
r

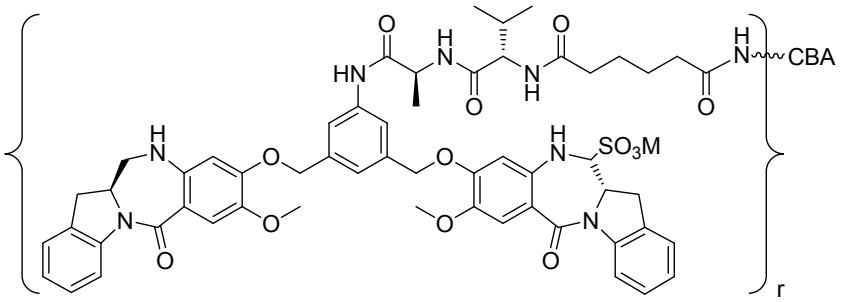
;


CBA
Y
Y
r

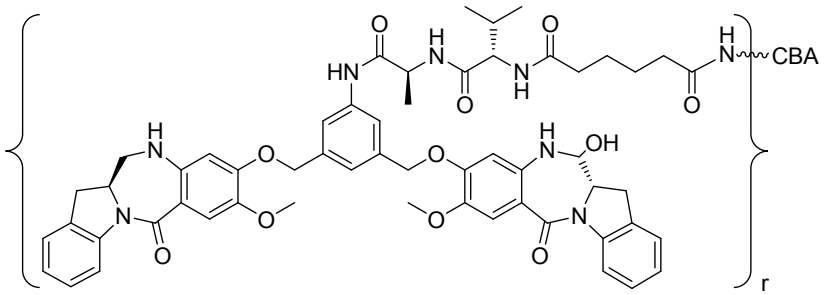
;


CBA
r

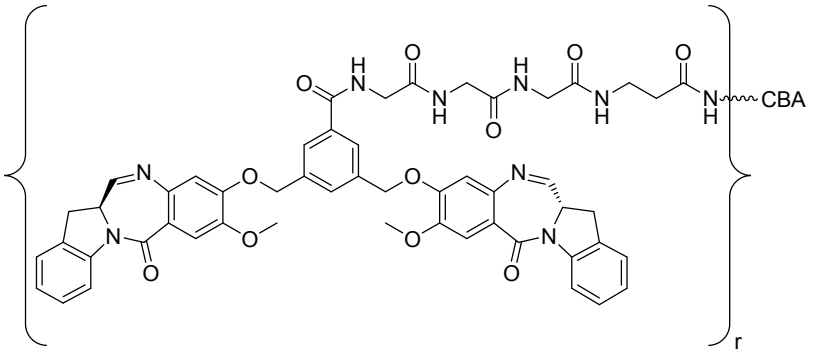
;


CBA
SO3M
r

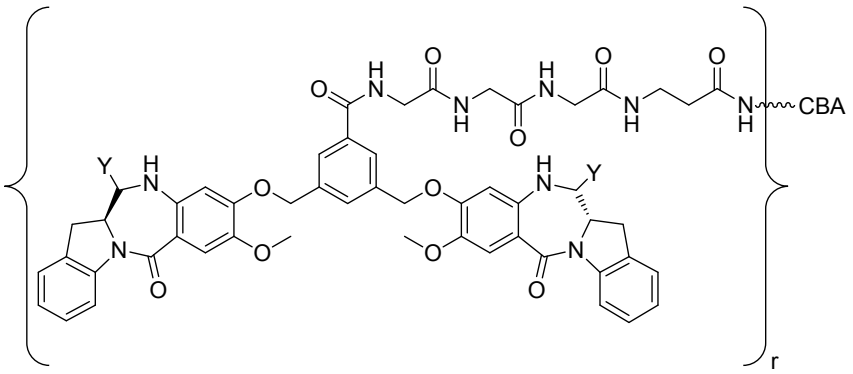
;


CBA
OH
r

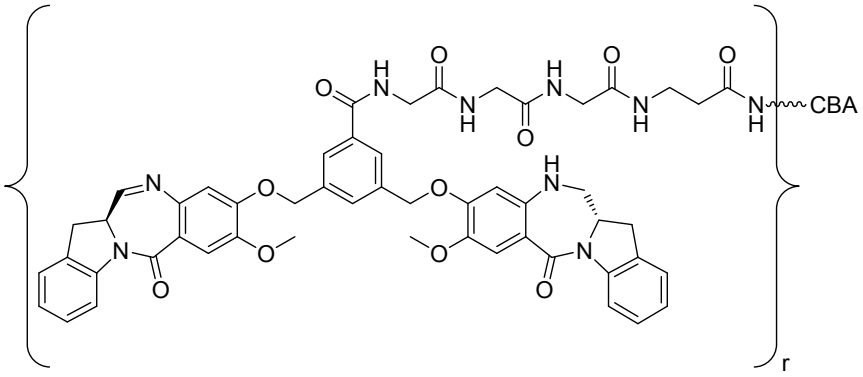
;


CBA
r

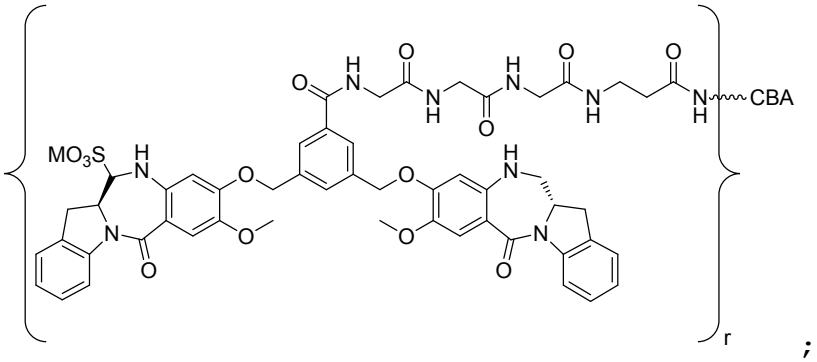
;


CBA
Y
Y
r

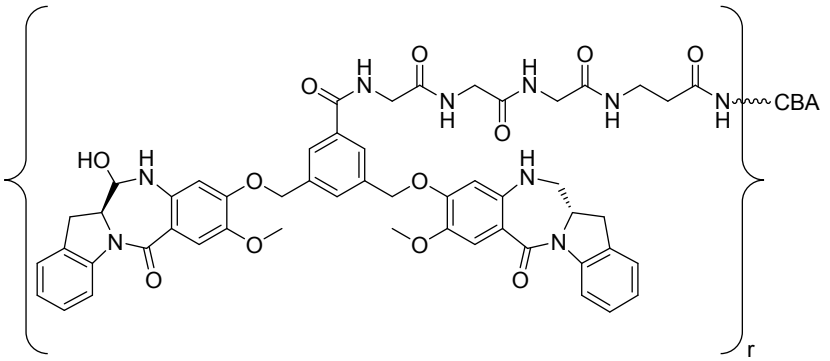
;


CBA
r

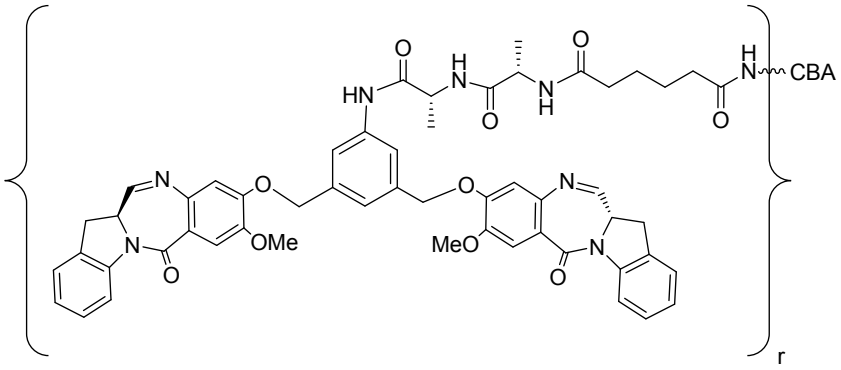
;


MO3S
CBA
r

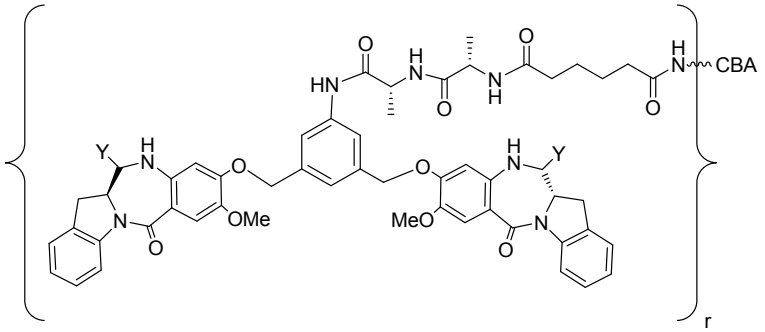
;


HO
CBA
r

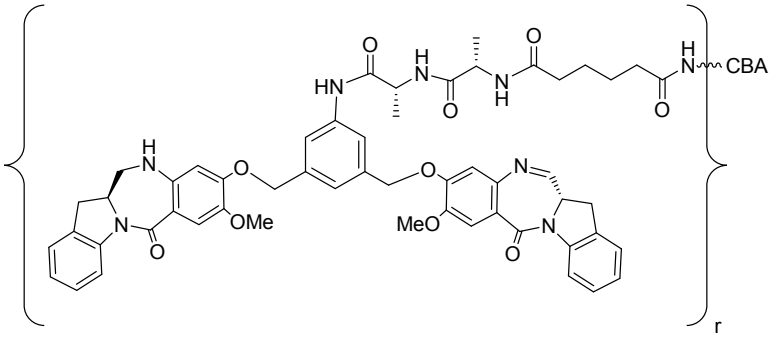
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
N
O
OMe
N
O
MeO
N
O
r

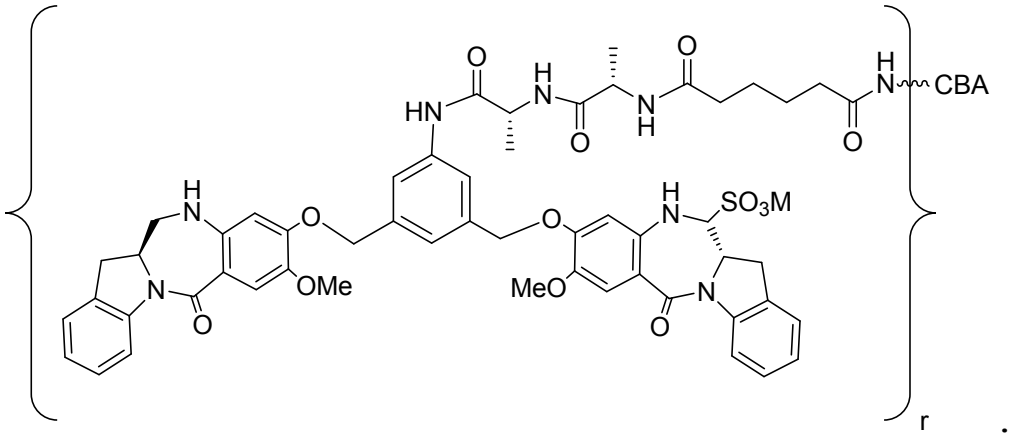
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
Y
H
N
O
OMe
N
O
H
N
Y
O
MeO
N
O
r

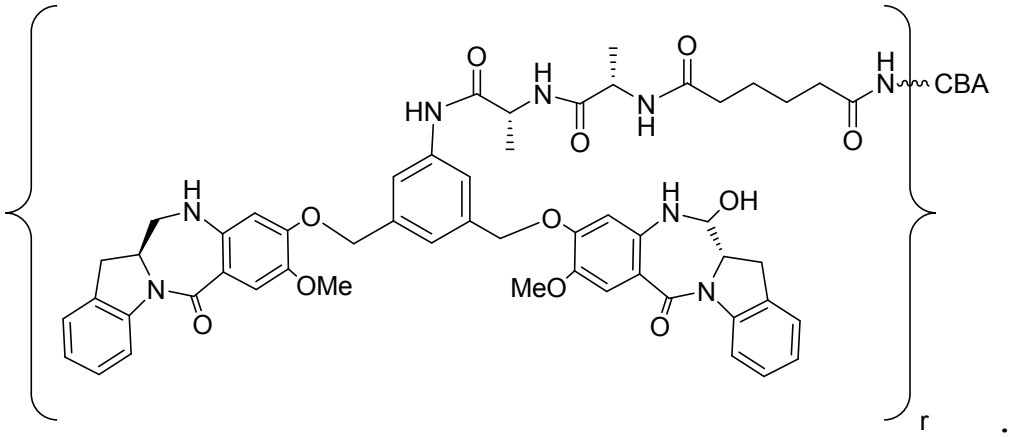
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
H
N
O
OMe
N
O
N
O
MeO
N
O
r

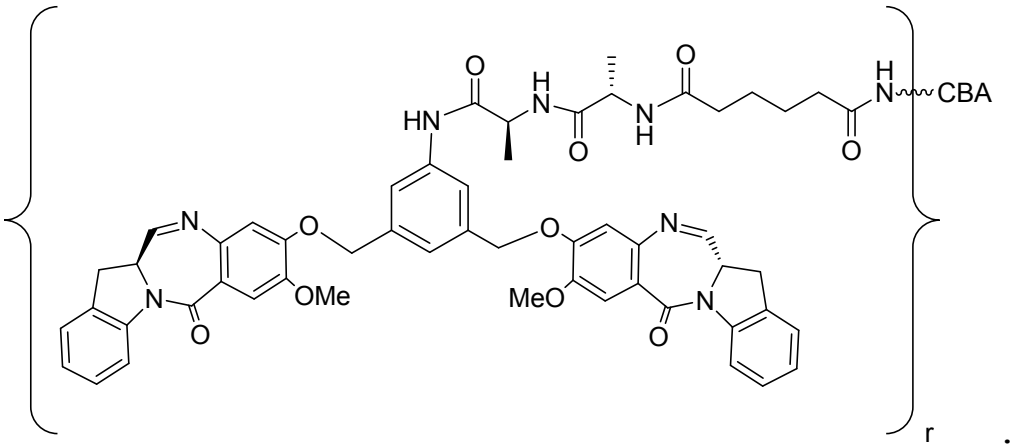
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
OMe
N
O
H
N
SO3M
MeO
O
N
O
r

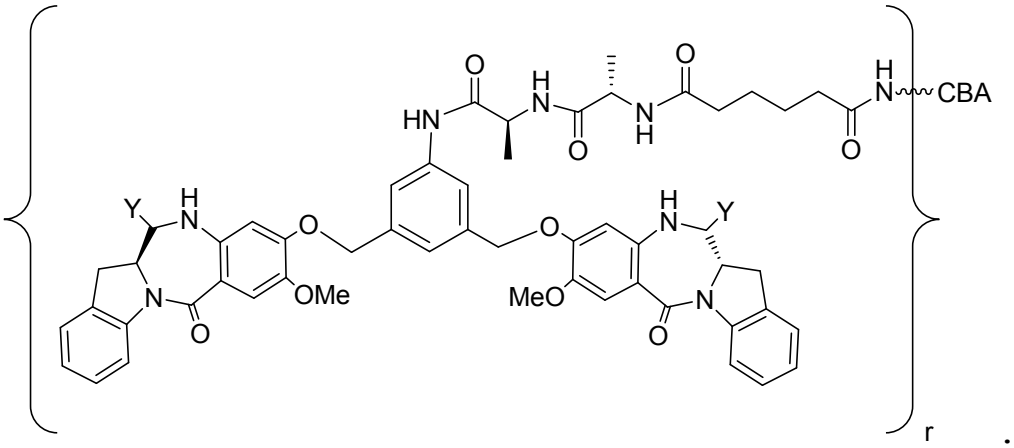
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
OMe
N
O
H
N
OH
MeO
O
N
O
r

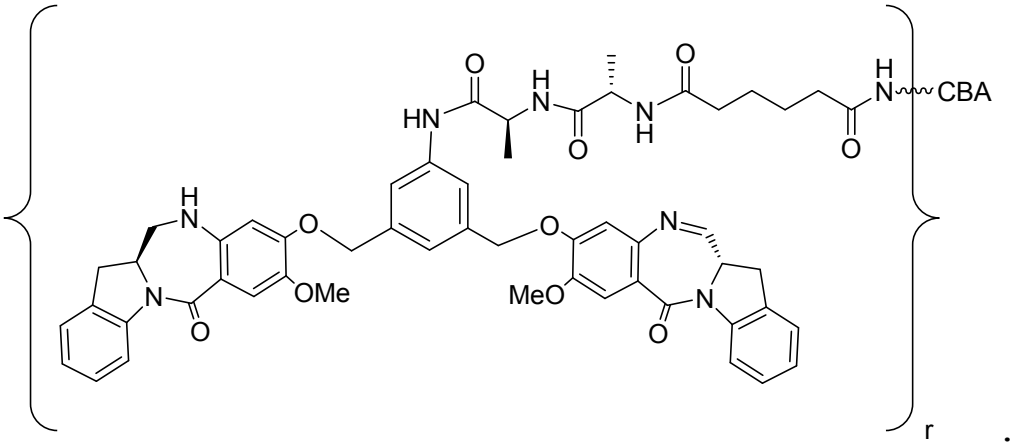
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
N
O
O
OMe
N
O
N
MeO
O
N
O
r

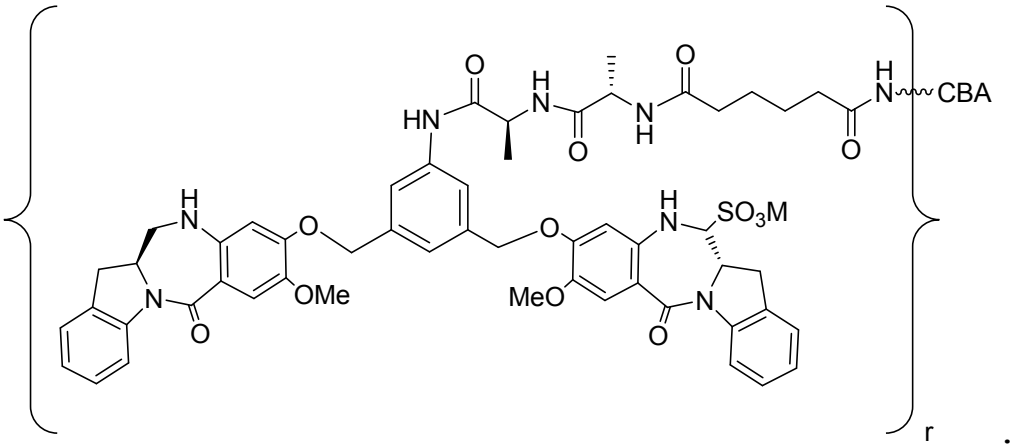
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O
N
r

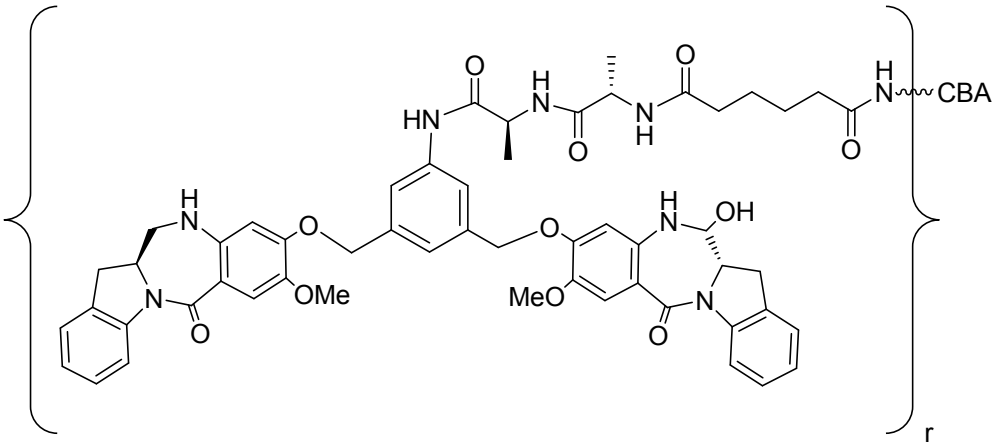
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
N
OMe
MeO
O
O
N
r

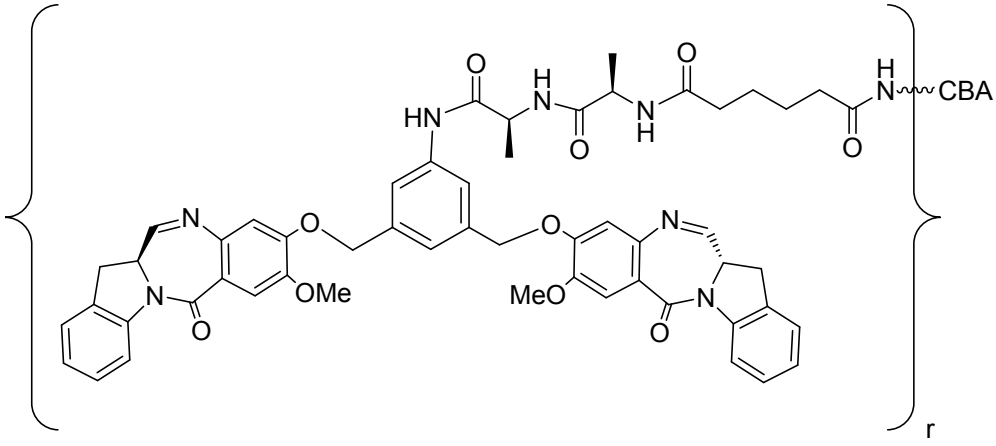
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
O
O
N
r

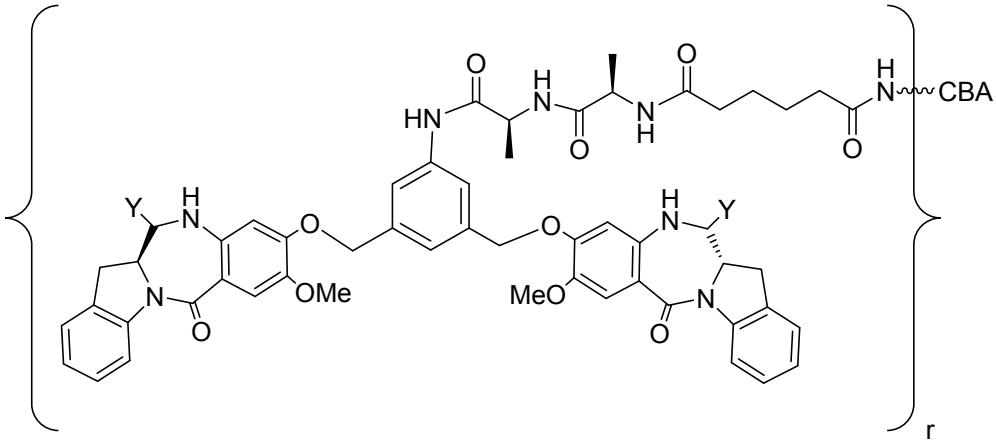
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
H
N
O
OMe
N
O
O
MeO
H
N
OH
N
O
r

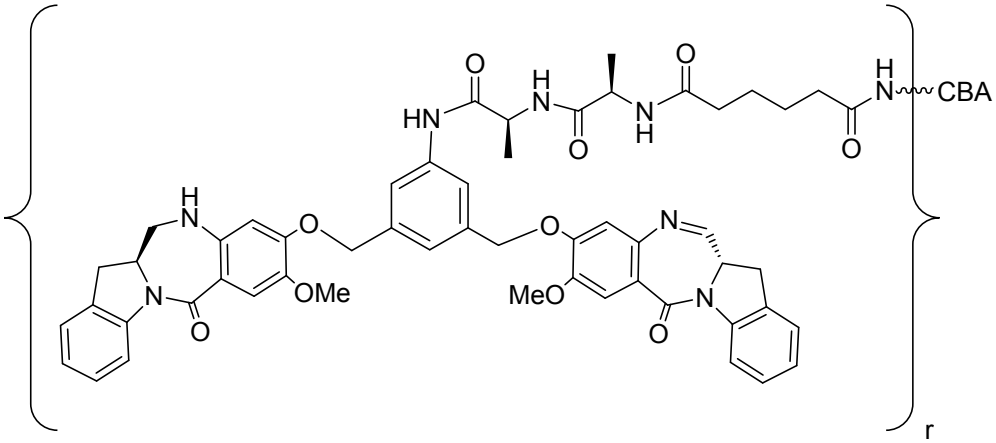
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
N
O
OMe
N
O
O
MeO
N
N
O
r

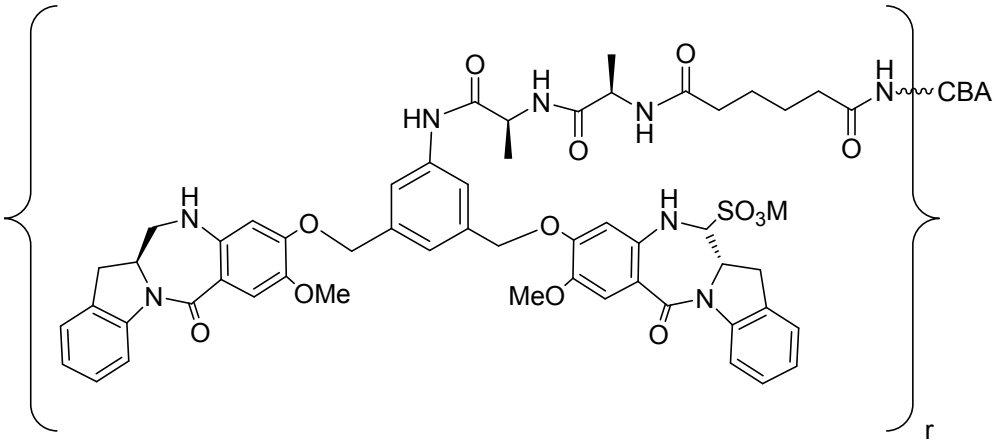
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
O
Y
H
N
O
OMe
N
O
O
MeO
H
N
Y
N
O
r

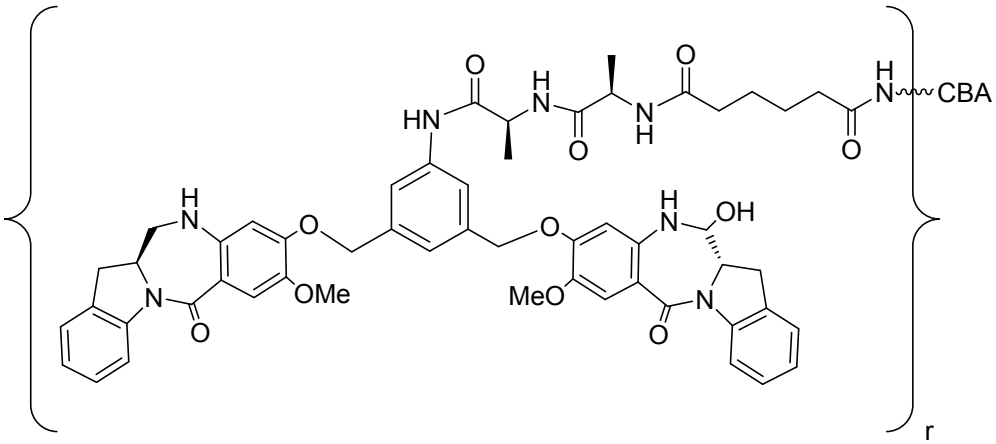
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

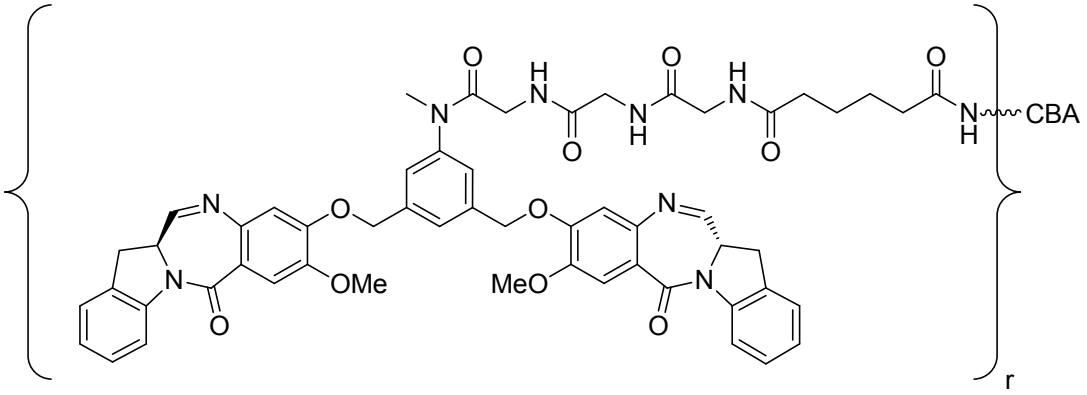
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

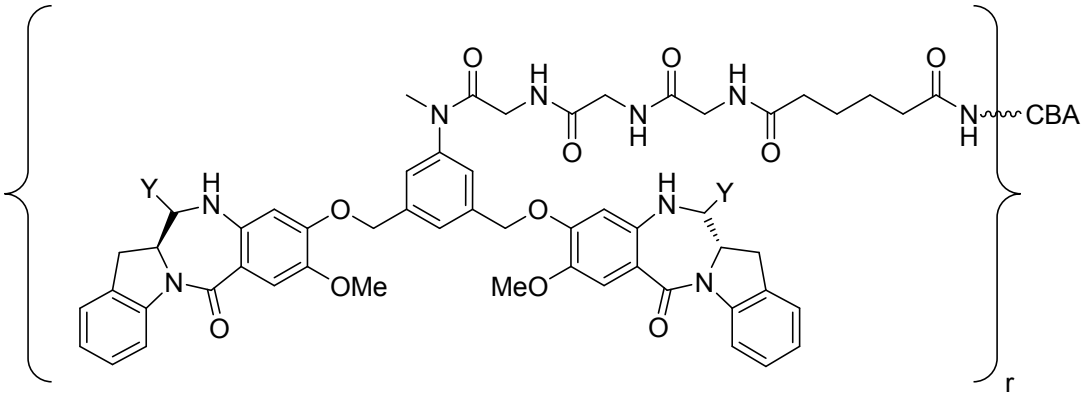
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
N
r

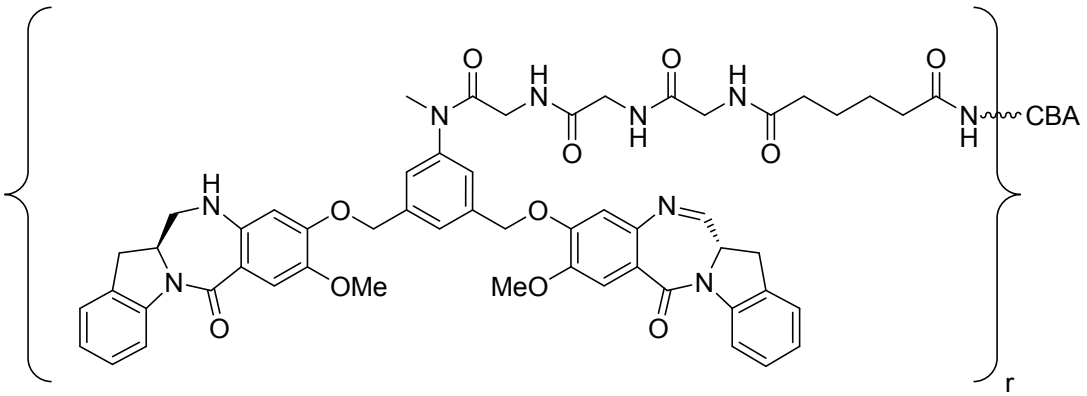
;


CBA
OMe
MeO
r

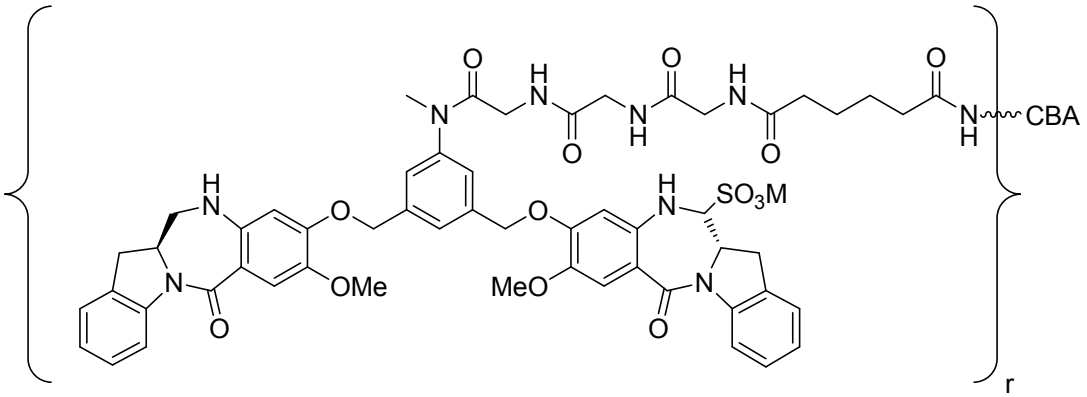
;


CBA
Y
OMe
MeO
r

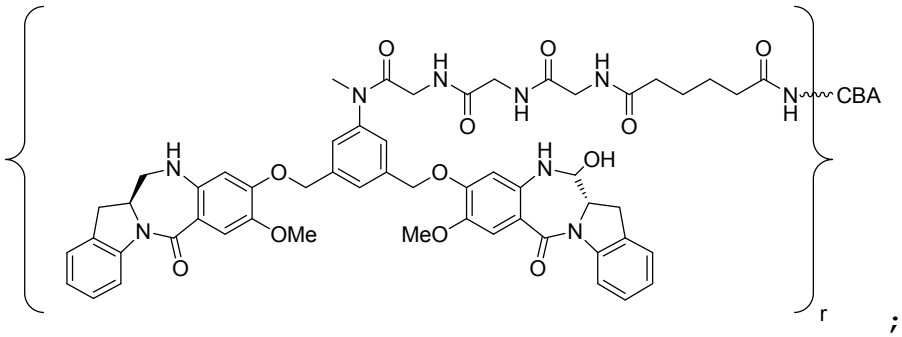
;


CBA
OMe
MeO
r

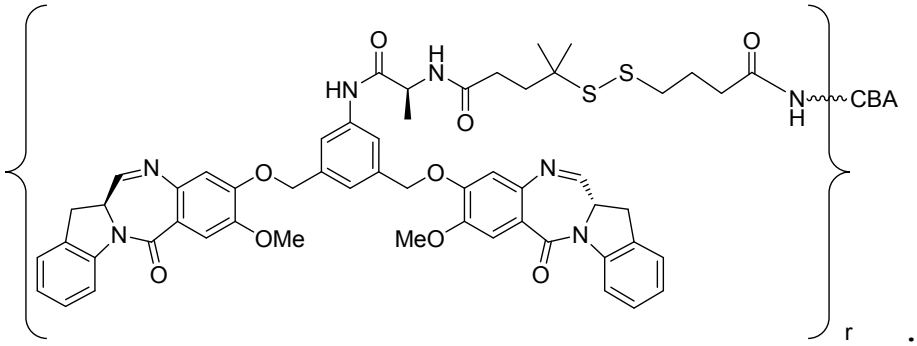
;


CBA
SO3M
OMe
MeO
r

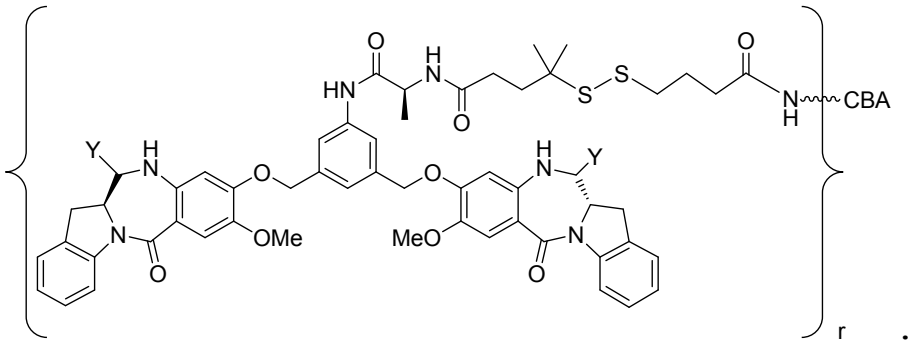
;


CBA
OMe
MeO
OH
r

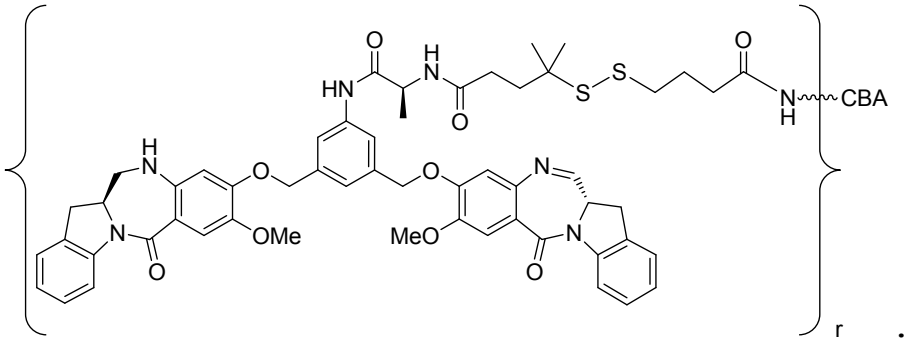
;


CBA
OMe
MeO
r

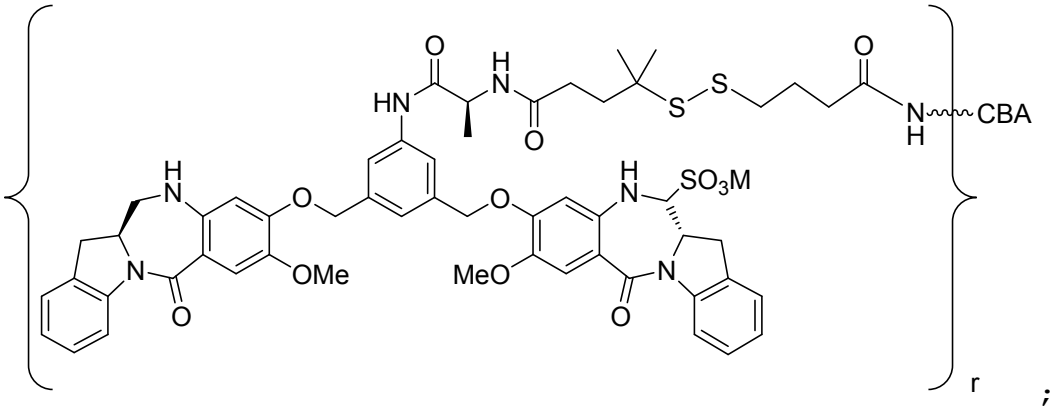
;


CBA
Y
OMe
MeO
r

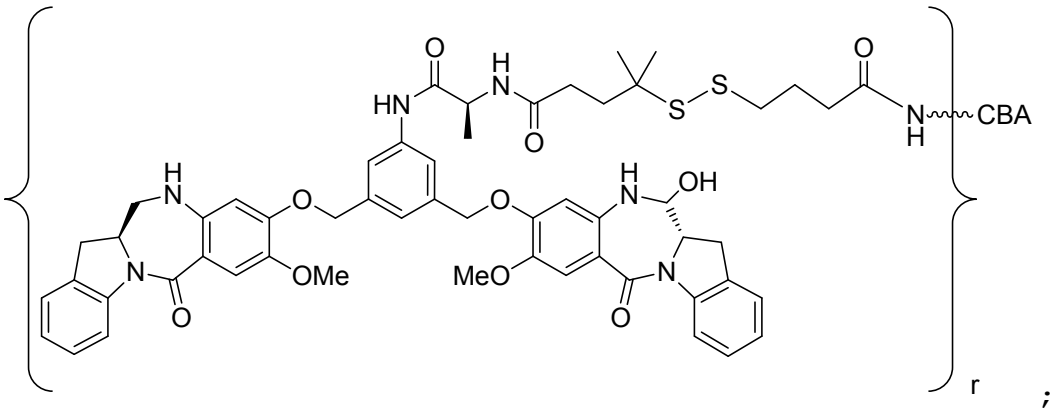
;


CBA
OMe
MeO
r

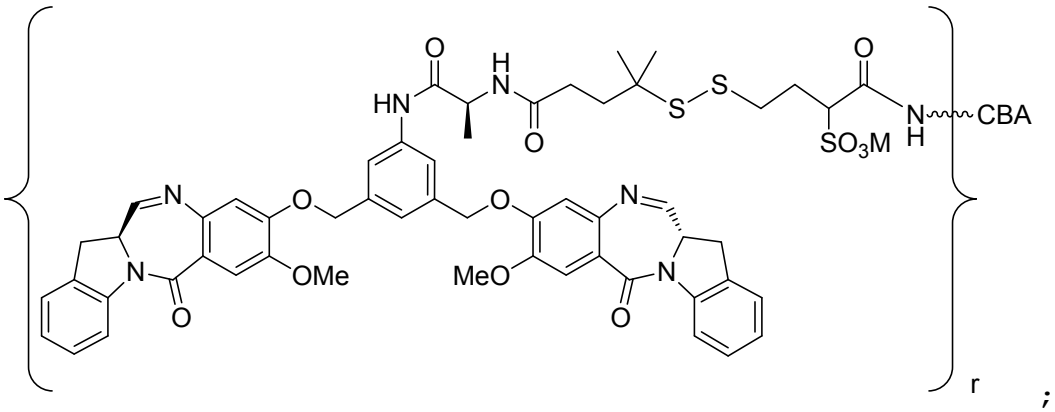
;


O
H
N
HN
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

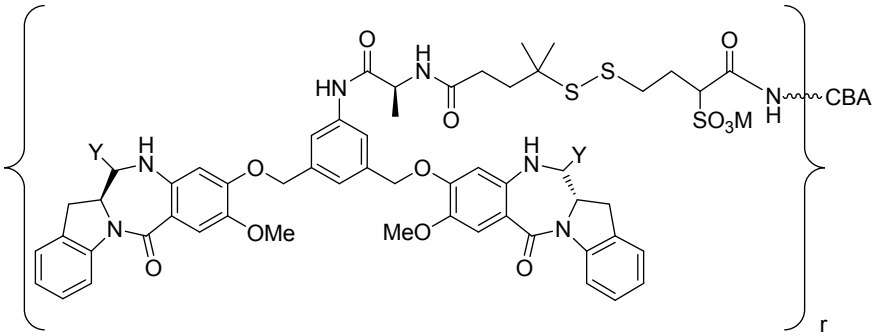
;


O
H
N
HN
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

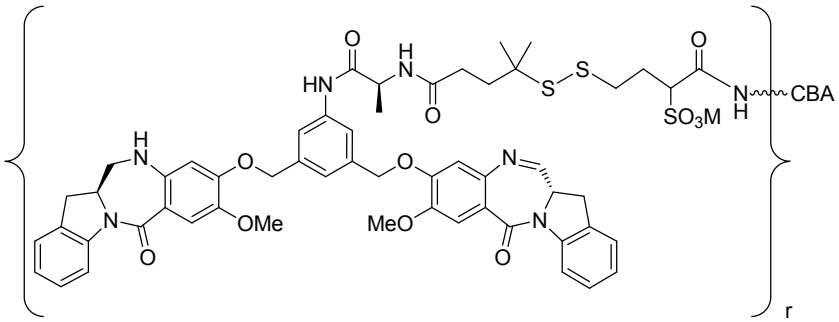
;


O
H
N
HN
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

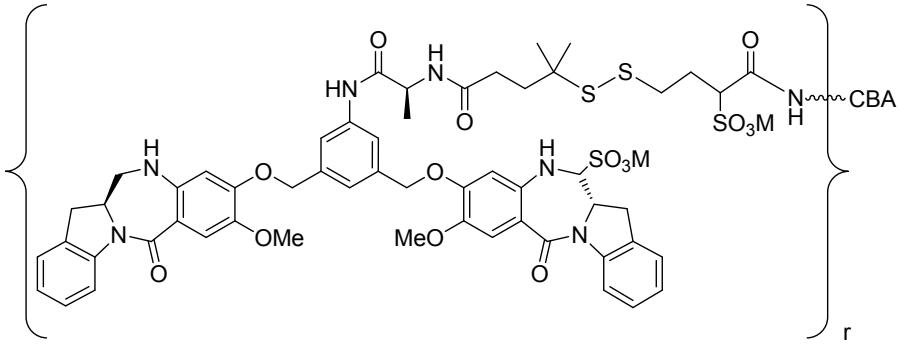
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

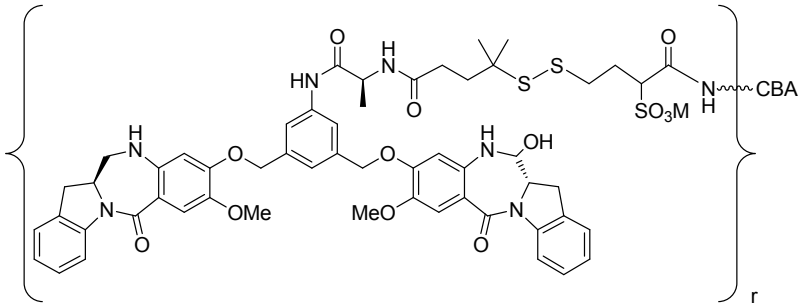
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

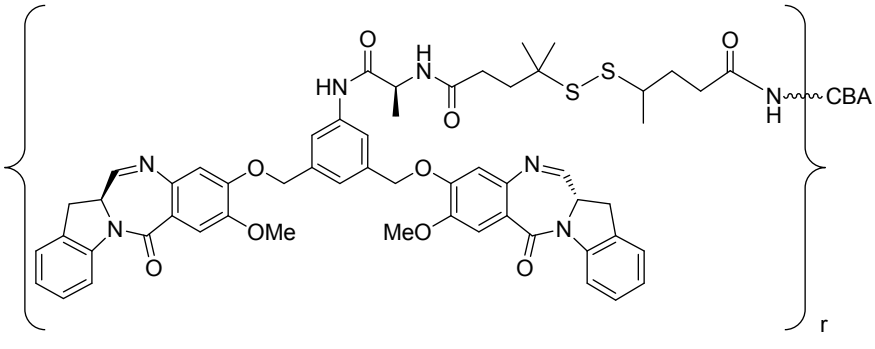
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
H
N
SO3M
OMe
MeO
N
O
O
r

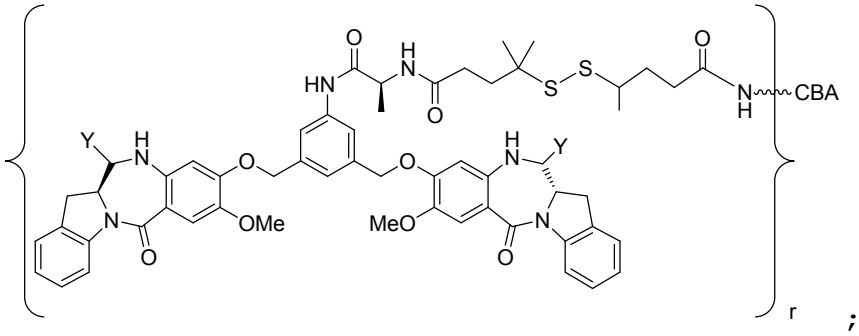
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
SO3M
H
N
O
O
H
N
OH
OMe
MeO
N
O
O
r

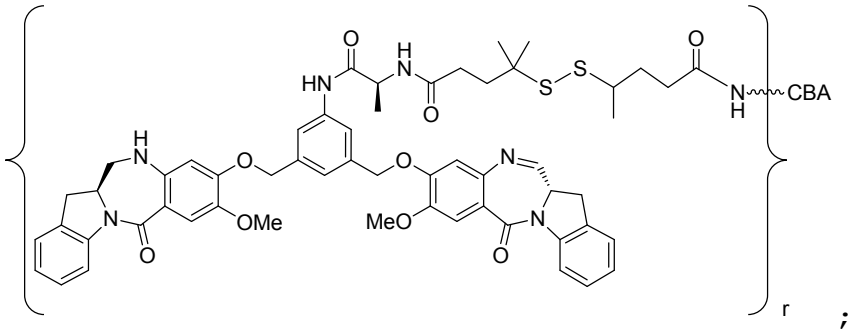
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

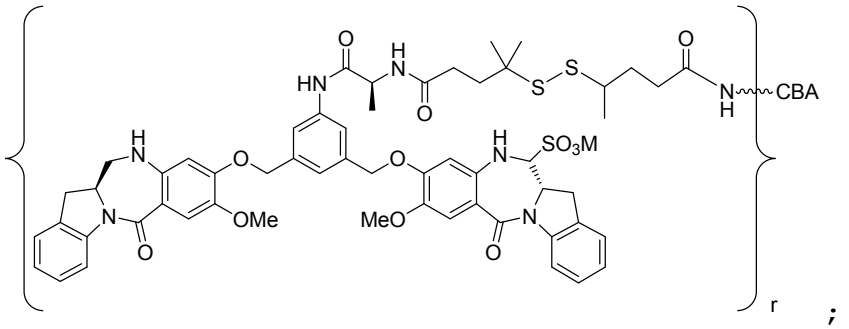
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

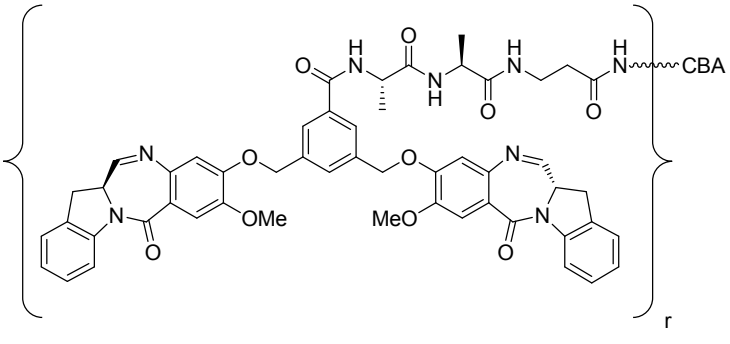
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

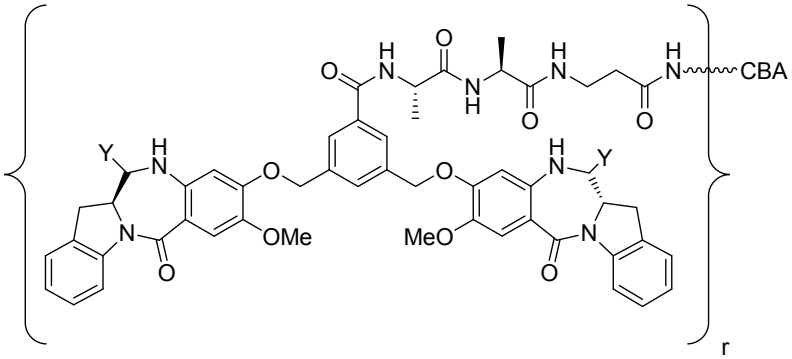
;


HN
O
H
N
O
S
S
O
N
H
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

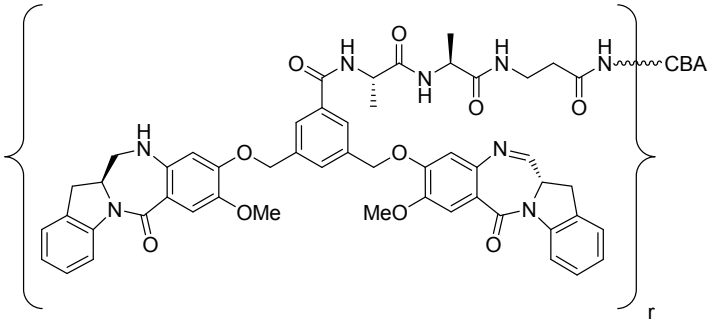
;


CBA
OMe
MeO
r

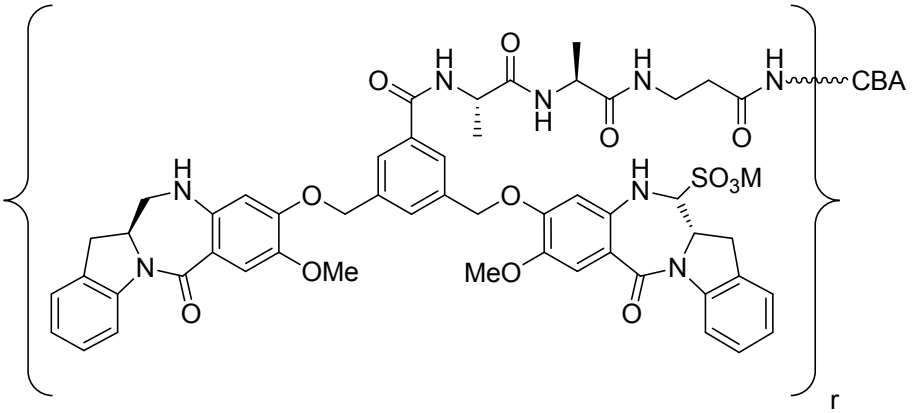
;


CBA
Y
OMe
MeO
r

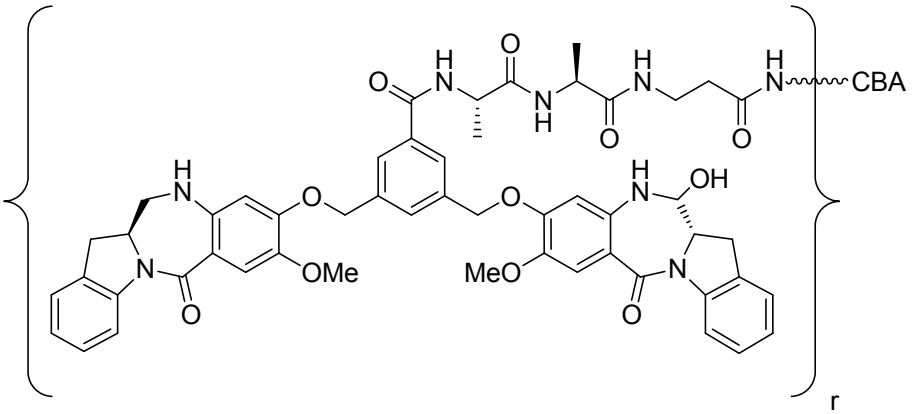
;


CBA
OMe
MeO
r

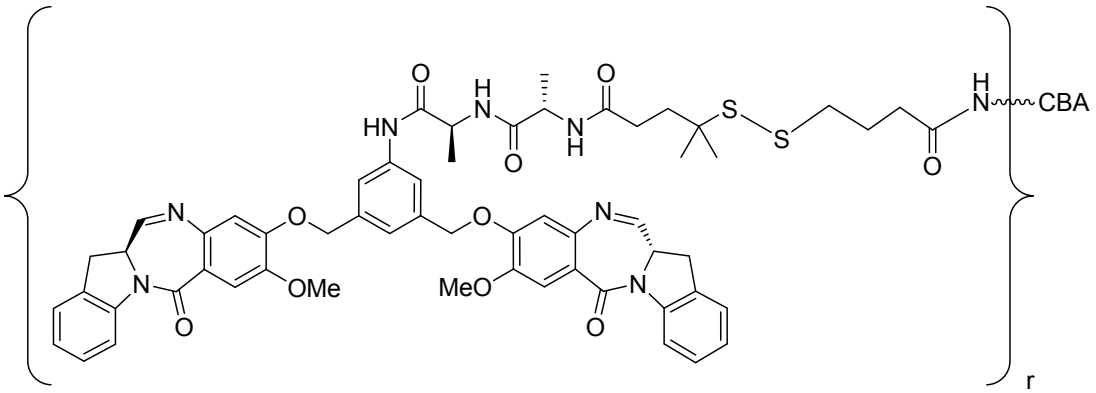
;


CBA
SO3M
OMe
MeO
r

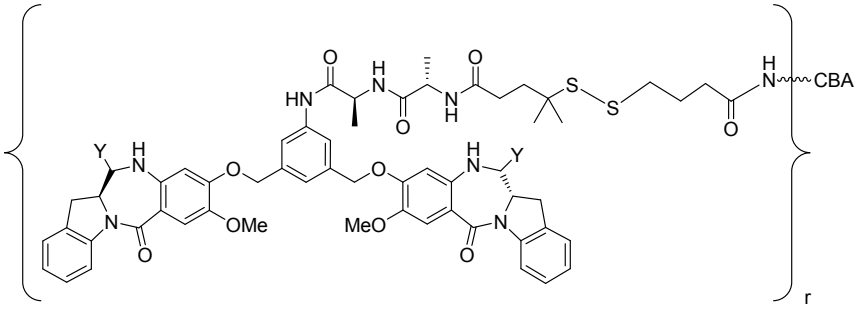
;


CBA
OH
OMe
MeO
r

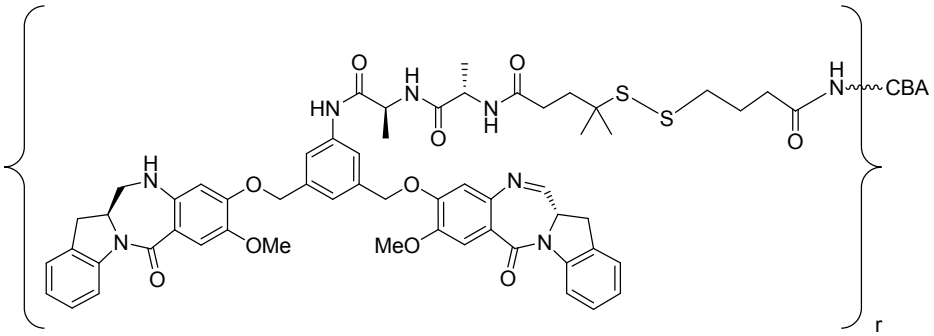
;


CBA
OMe
MeO
r

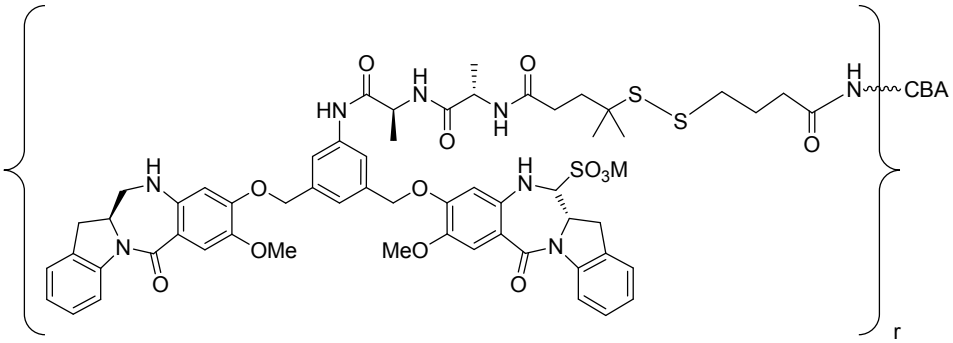
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

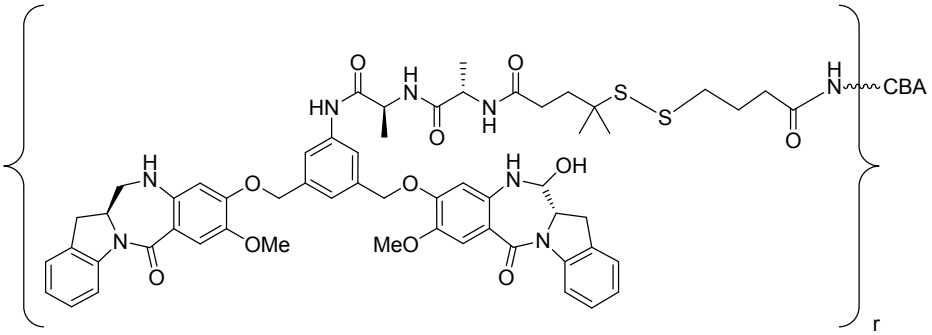
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

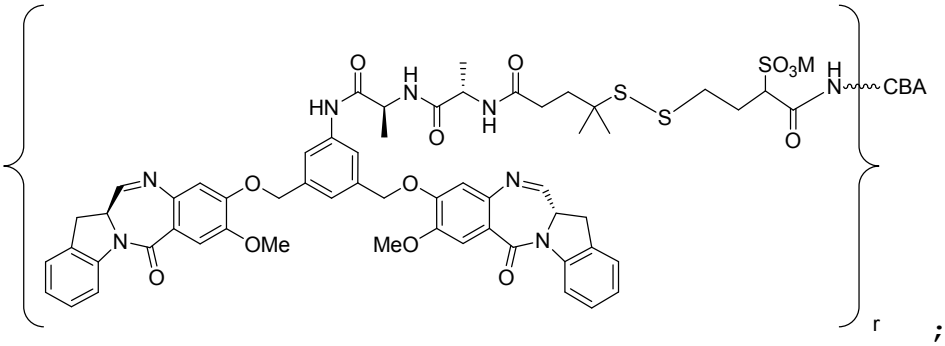
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

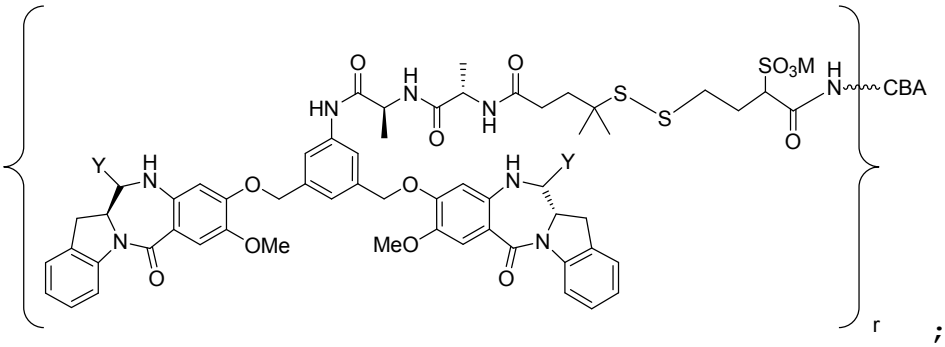
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

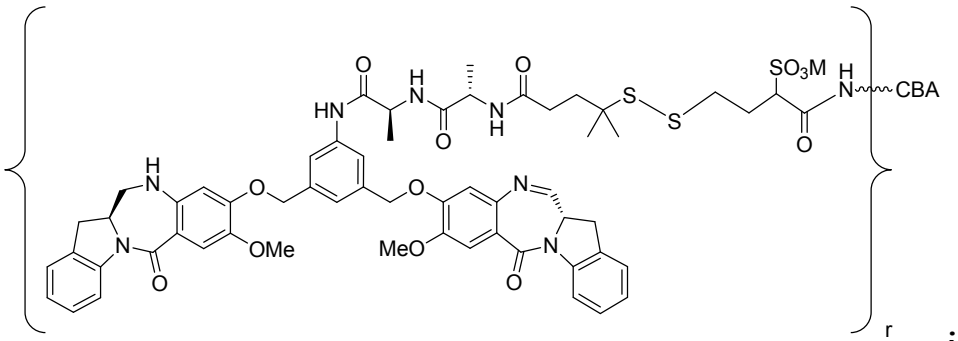
;


SO3M
CBA
OMe
MeO
r

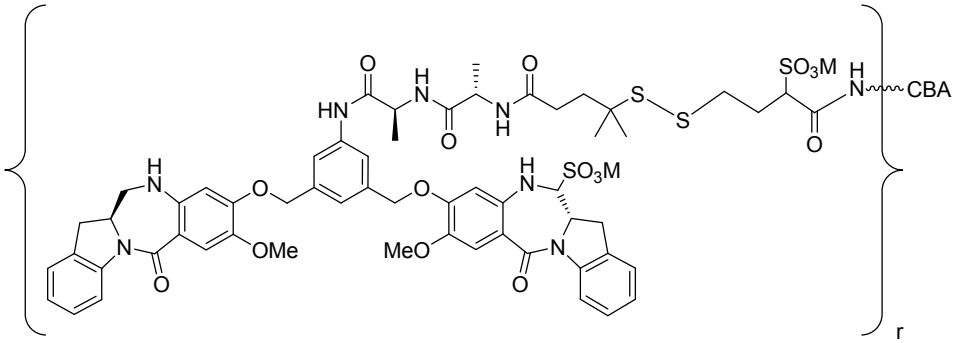
;


SO3M
CBA
Y
OMe
MeO
r

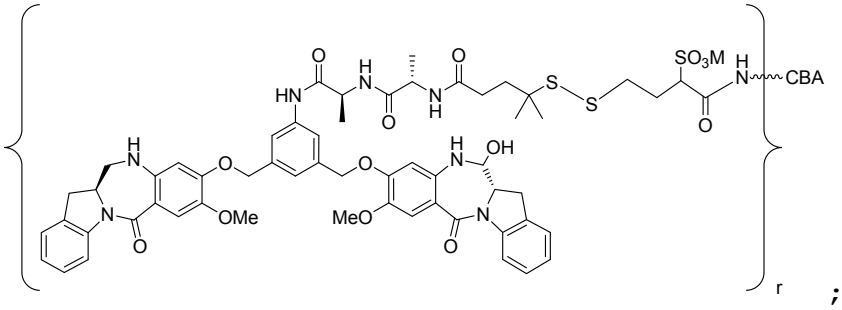
;


SO3M
CBA
OMe
MeO
r

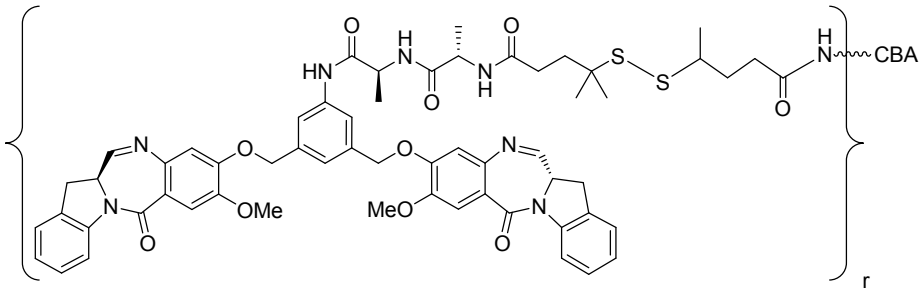
;


SO3M
CBA
SO3M
OMe
MeO
r

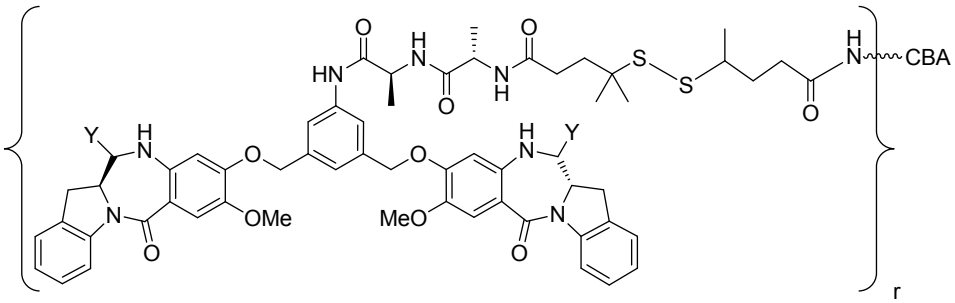
;


SO3M
CBA
OMe
MeO
OH
r

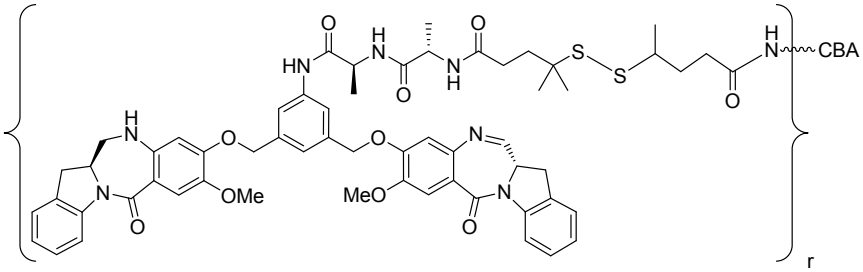
;


CBA
OMe
MeO
r

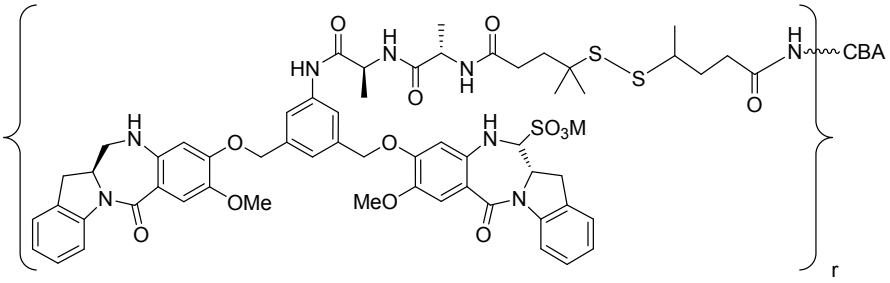
;


Y
CBA
OMe
MeO
r

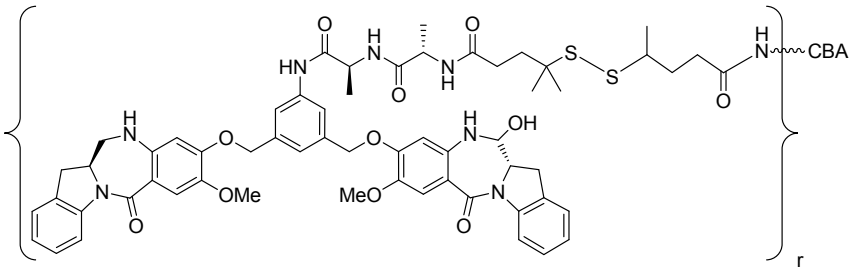
;


CBA
OMe
MeO
r

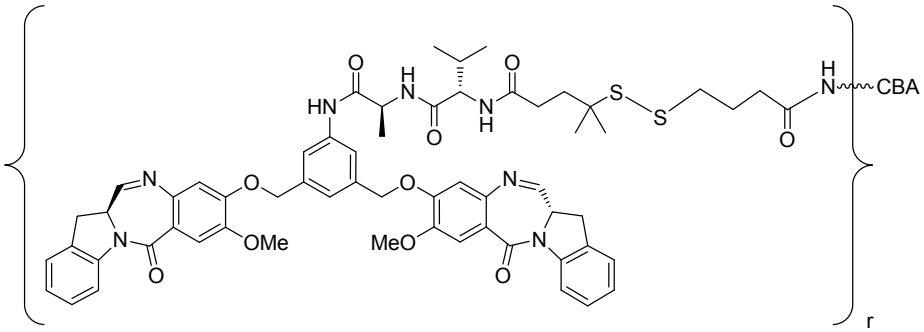
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

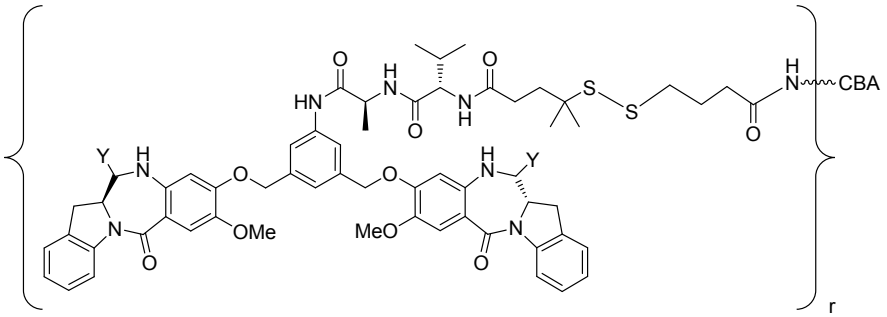
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

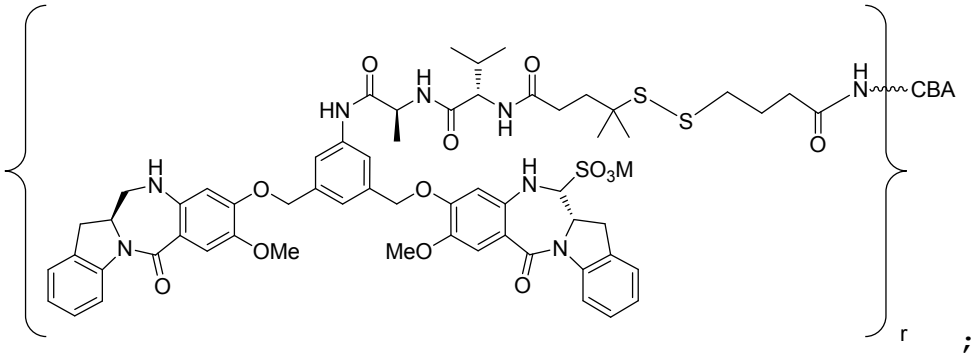
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
S
S
O
H
N
CBA
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

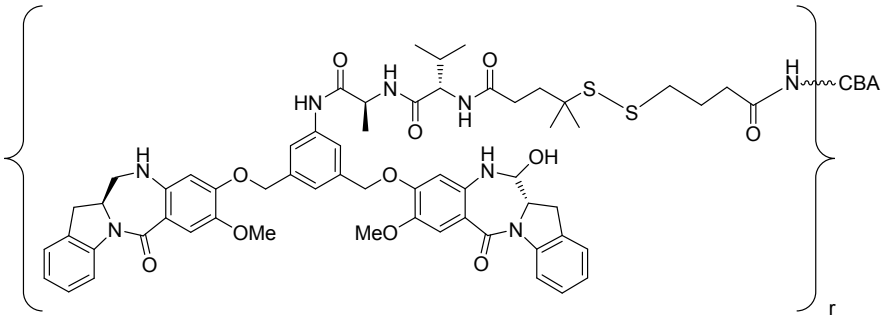
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
S
S
O
H
N
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

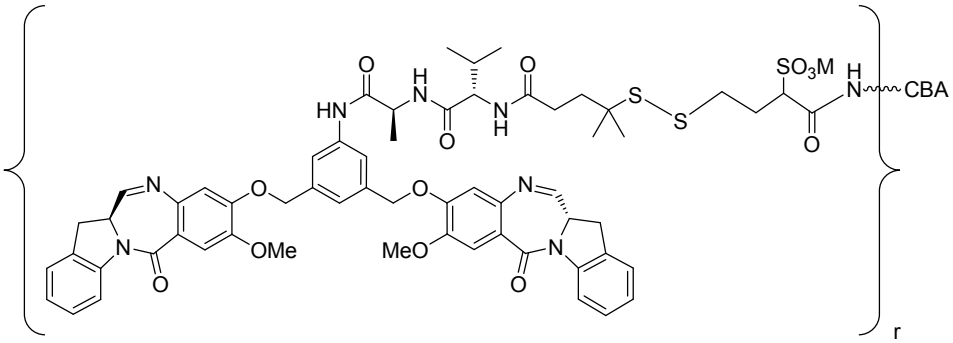
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O
r

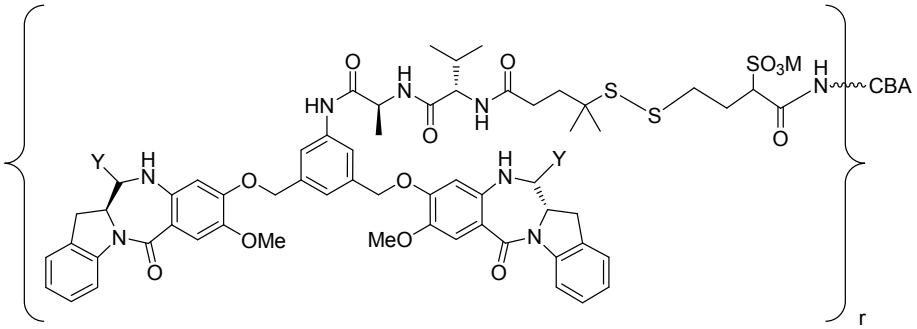
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

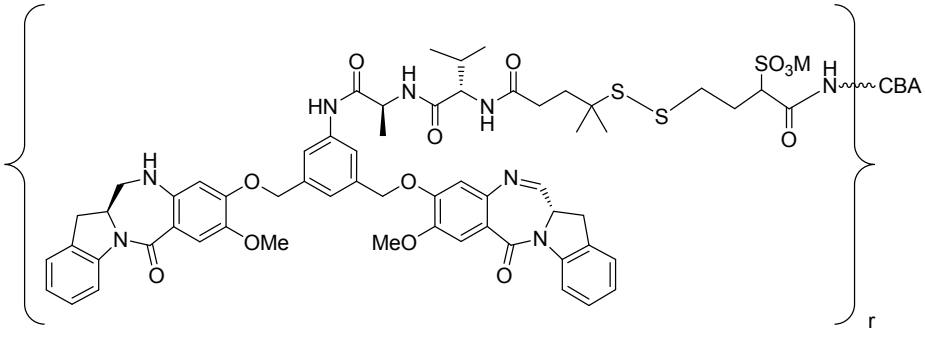
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
S
S
SO3M
O
H
N
CBA
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O
r

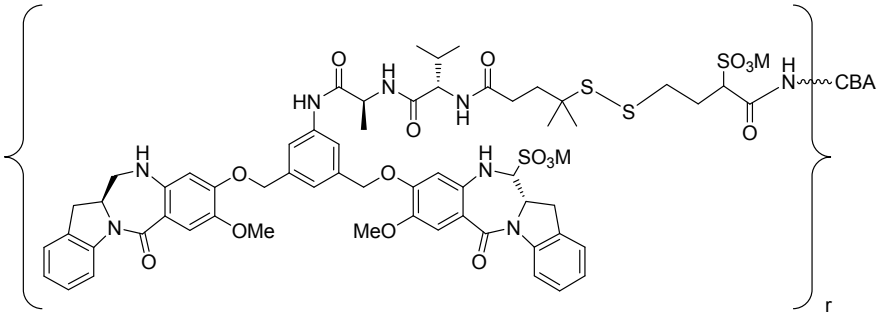
;


HN
O
H
N
O
H
N
O
S
S
SO3M
O
H
N
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

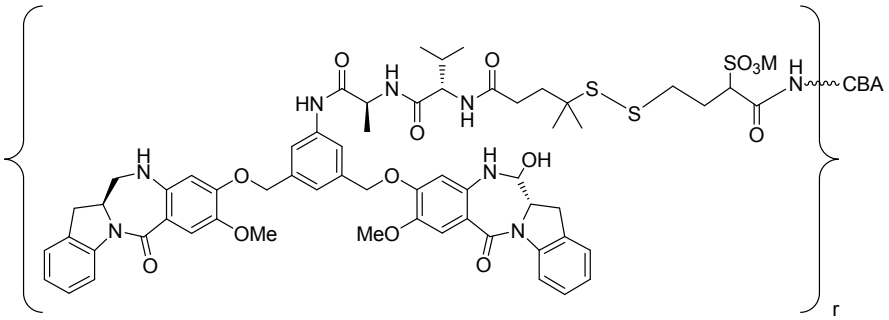
;



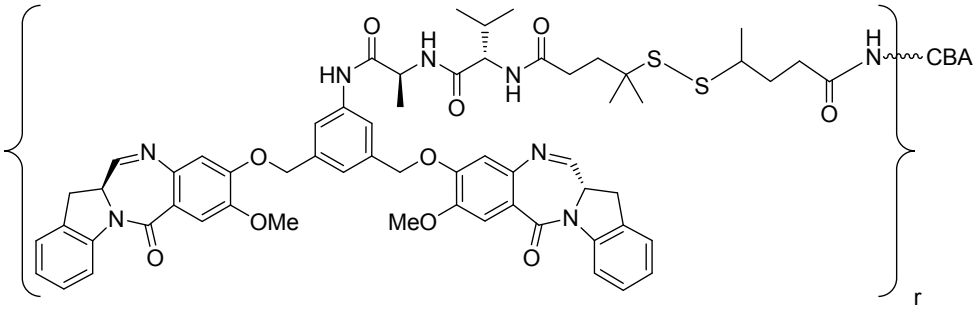
r ;



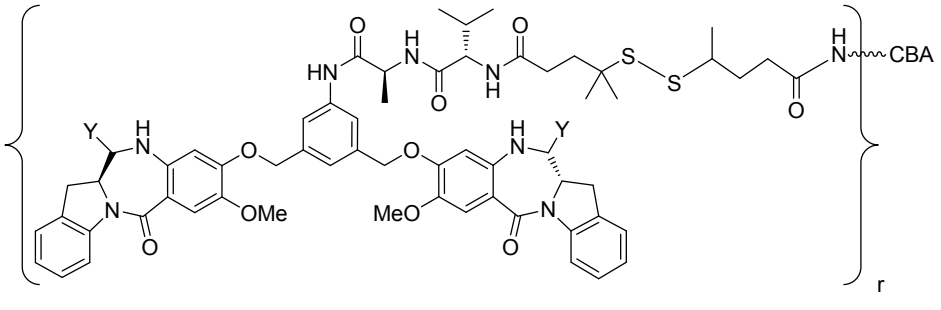
r ;



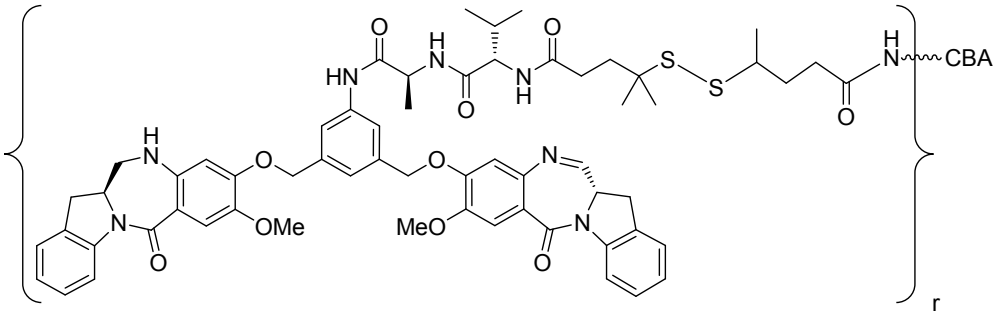
r ;



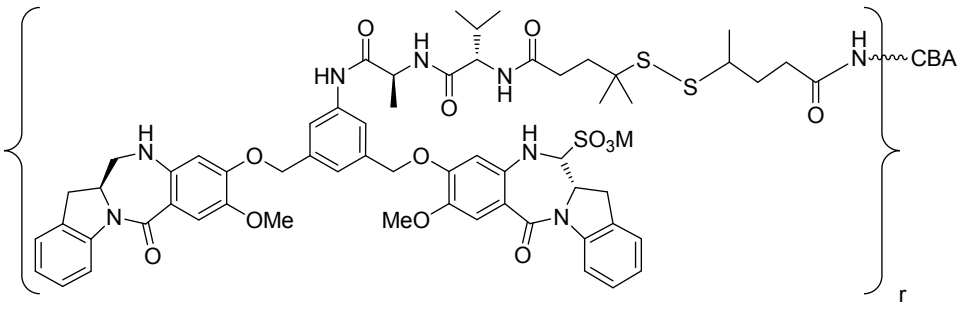
r ;


CBA
r

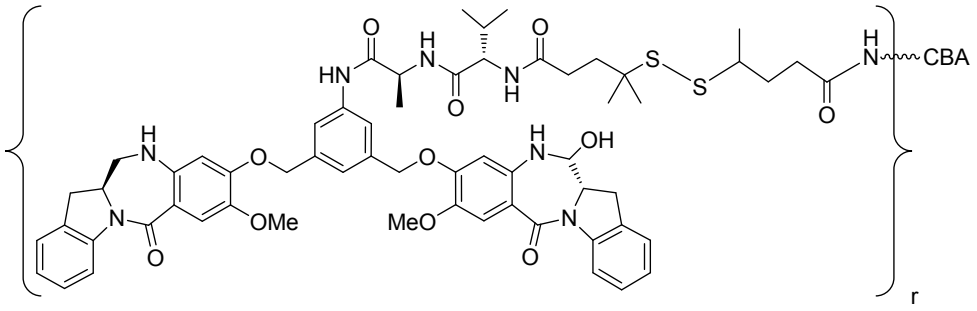
;


CBA
r

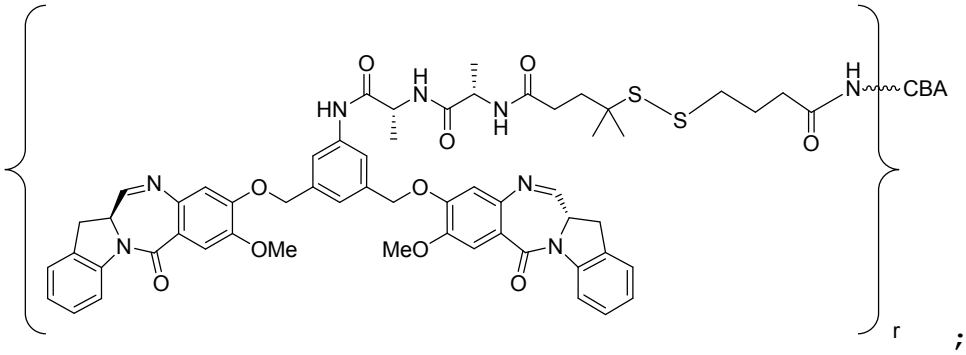
;


CBA
r

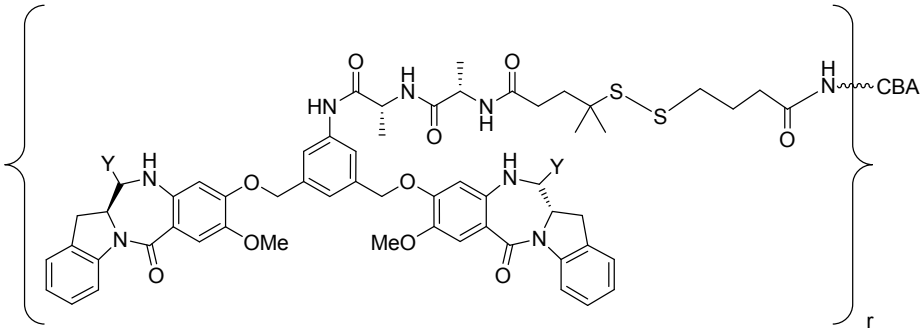
;


CBA
r

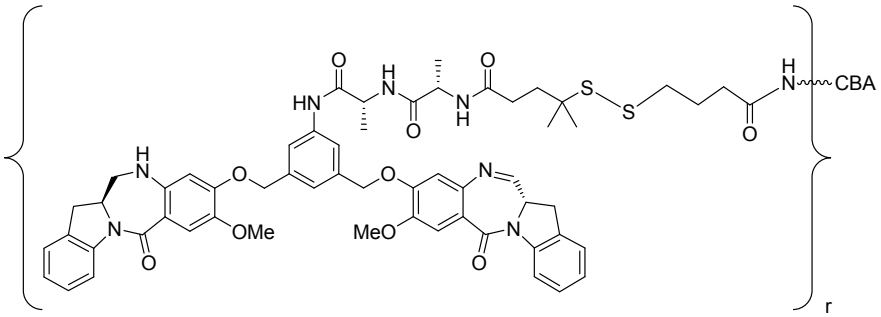
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O
r

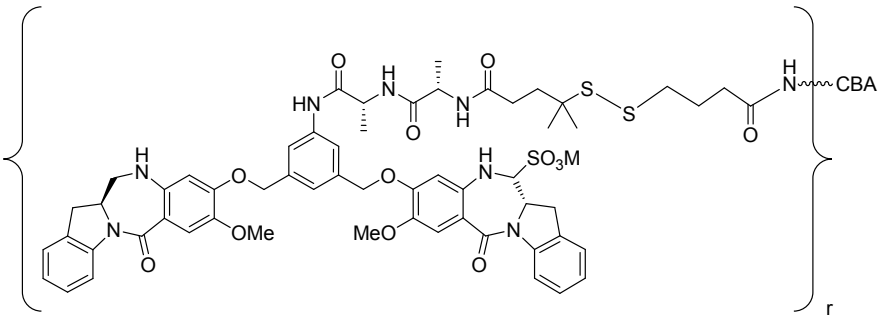
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
O
O
r

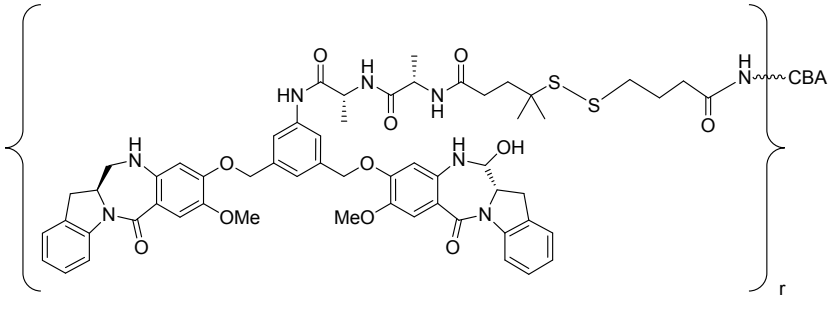
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O
r

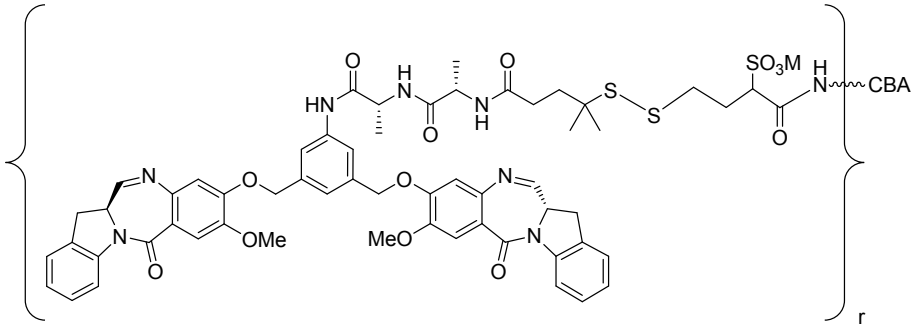
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
O
O
r

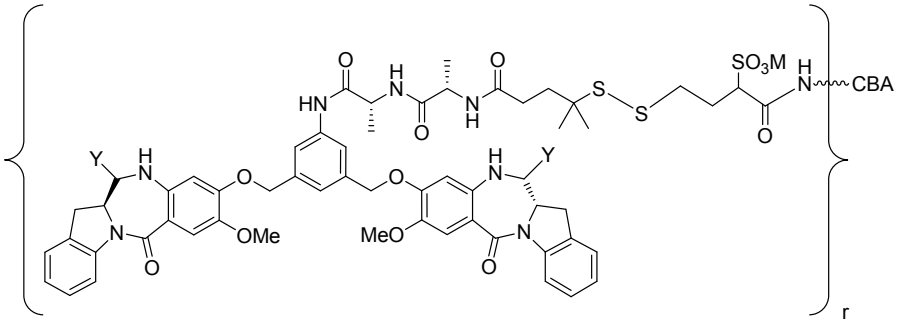
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
O
H
N
CBA
H
N
O
O
OH
N
OMe
MeO
N
O
O
r

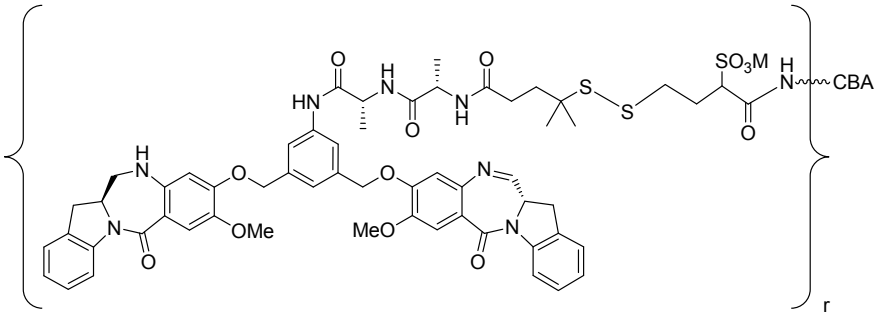
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
SO3M
H
N
CBA
O
N
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

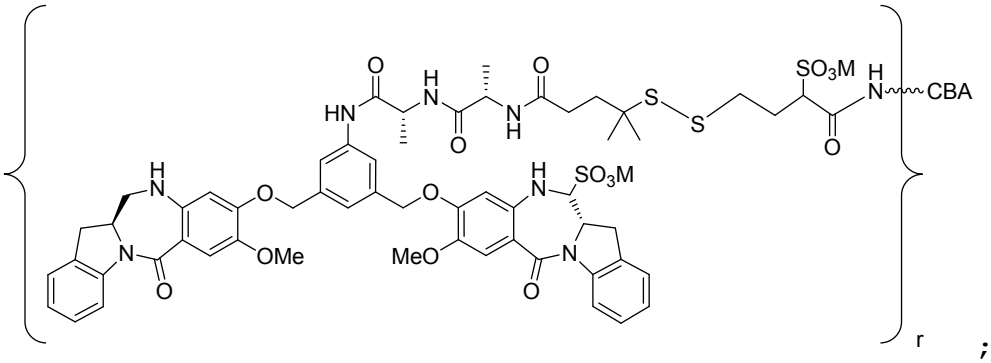
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
SO3M
H
N
CBA
O
Y
H
N
O
O
H
N
Y
N
OMe
MeO
N
O
O
r

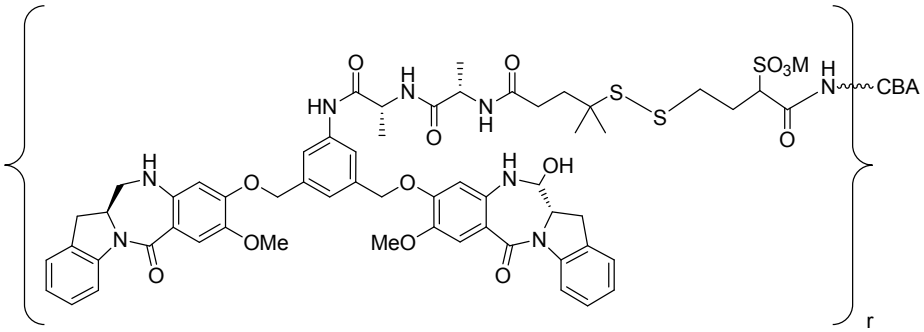
;


HN
O
H
N
O
N
H
S
S
SO3M
H
N
CBA
O
H
N
O
O
N
OMe
MeO
N
O
O
r

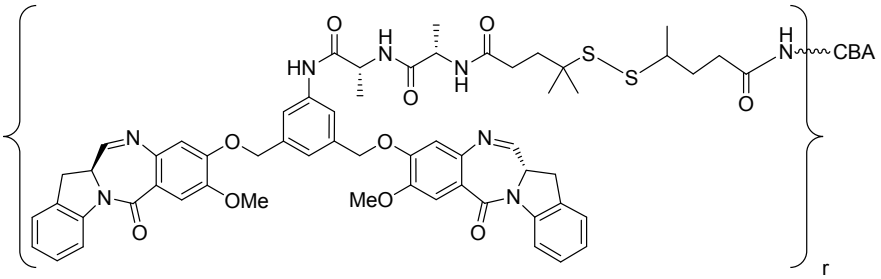
;


SO3M
CBA
OMe
MeO
r

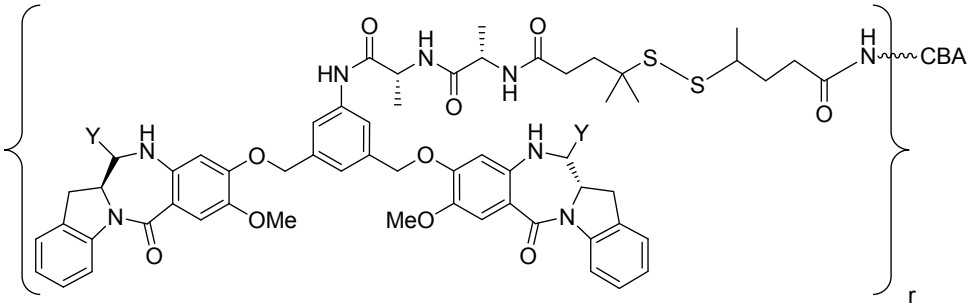
;


SO3M
CBA
OH
OMe
MeO
r

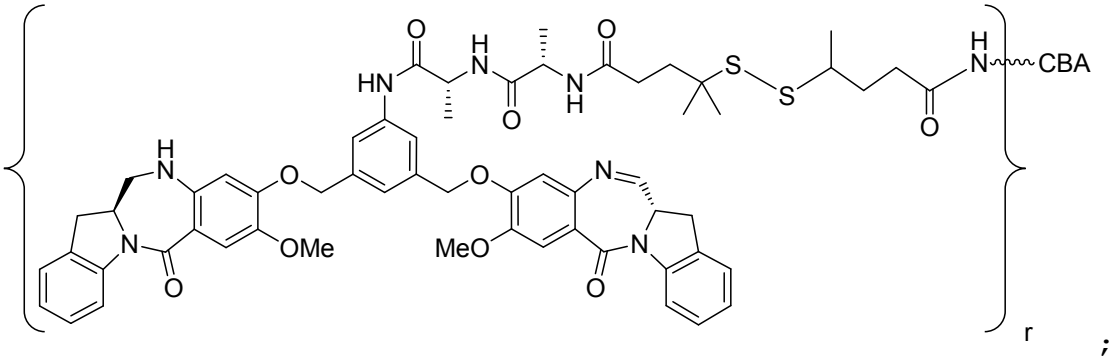
;


CBA
OMe
MeO
r

;

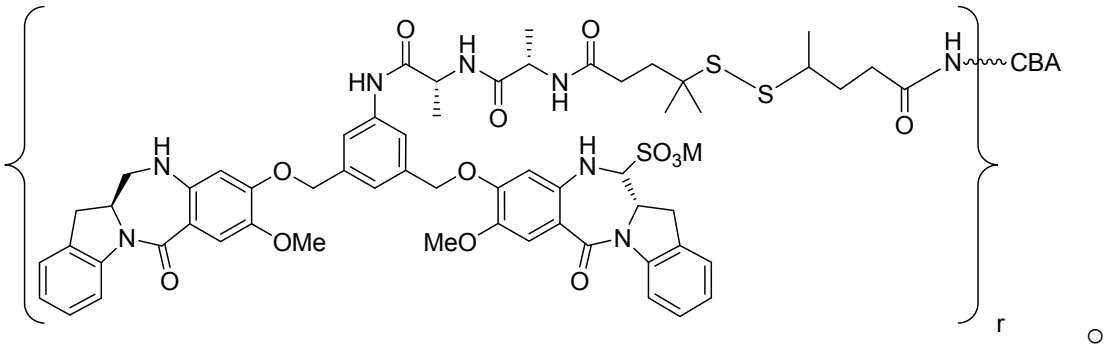

CBA
Y
OMe
MeO
r

;

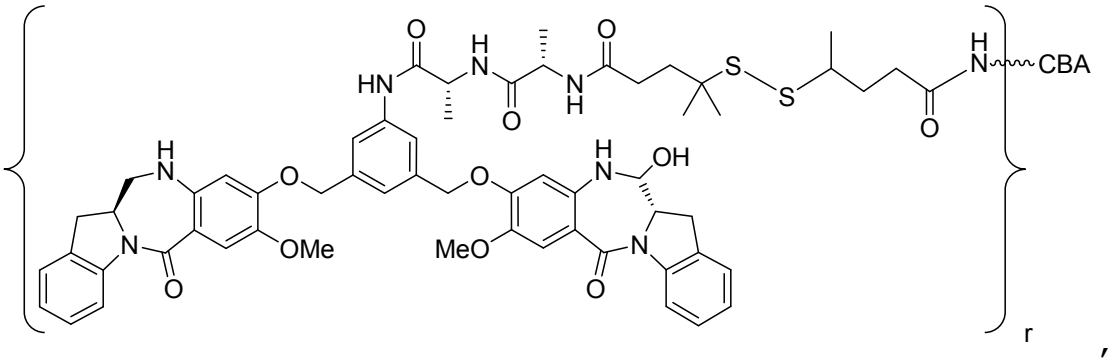


;

o



o



,

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

r es un entero entre 1 y 10;

Y es –H, -OH o $-SO_3M$; y

M es un catión farmacéuticamente aceptable (p. ej., H^+, Na^+ o K^+).

Más específicamente, Y es $-SO_3M$. Alternativamente, Y es –OH.

En determinadas modalidades, los conjugados descritos en la presente, por ejemplo los descritos en la segunda modalidad o de la 1ª a la 15ª modalidades específicas, pueden comprender 1-10 compuestos citotóxicos, 2-9 compuestos citotóxicos, 3-8 compuestos citotóxicos, 4-7 compuestos citotóxicos o 5-6 compuestos citotóxicos, donde cada compuesto citotóxico comprende el grupo enlazador que enlaza el compuesto citotóxico al CBA, y cada compuesto citotóxico en el conjugado es el mismo.

En cualquiera de las modalidades de conjugados, por ejemplo la segunda modalidad o de la 1ª a la 15ª modalidades específicas, el agente de unión celular se puede unir a células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas con virus, células infectadas con microorganismos, células infectadas con parásitos, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o

melanocitos; células que expresan la CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA, o antígenos Her-2; antígenos Her-3; o células que expresan receptor del factor de crecimiento de insulinas, receptor del factor de crecimiento epidérmico y receptor de folato.

En cualquiera de las modalidades de conjugados, por ejemplo la segunda modalidad o de la 1ª a la 15ª modalidades específicas, el agente de unión celular puede ser un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana, una linfocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias o una molécula de transporte de nutrientes.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena simple revestido o un fragmento de anticuerpo revestido.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple o un fragmento de anticuerpo monoclonal de este.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado.

En cualquiera de las modalidades de conjugados anteriores, por ejemplo la segunda modalidad o de la 1ª a la 15ª modalidades específicas, el agente de unión celular puede ser un anticuerpo del receptor anti-folato o un fragmento de anticuerpo de este. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es anticuerpo huMOV19.

Alternativamente, en cualquiera de las modalidades de conjugados anteriores, por ejemplo la segunda modalidad o de la 1ª a la 15ª modalidades específicas, el agente de unión celular puede ser un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una modalidad, el anticuerpo anti-EGFR

es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592, que se incorpora a la presente mediante referencia. En otra modalidad, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

La invención además proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente un conjugado que comprende cualquiera de los compuestos en cuestión unidos a un agente de unión celular.

La invención además proporciona un método para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmune, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad renal en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos (con o sin grupo enlazador) o

los conjugados de la invención y, opcionalmente, un segundo agente quimioterapéutico.

En determinadas modalidades, el segundo agente quimioterapéutico se administra al mamífero secuencial o consecutivamente.

En determinadas modalidades, el método es para tratar una afección seleccionada de cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección e inmunodeficiencia.

En determinadas modalidades, el método o conjugado es para tratar cáncer.

En determinadas modalidades, el cáncer es un cáncer hematológico o un tumor sólido. Más específicamente, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, melanoma, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de próstata, cáncer endometrial, linfoma (p. ej., linfoma no Hodgkin), síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer peritoneal o leucemia

(p. ej., leucemia mieloide aguda (AML), leucemia monocítica aguda, leucemia promielocítica, leucemia eosinofílica, leucemia linfoblástica aguda (p. ej., B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML)).

PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DE AGENTE DE UNIÓN CELULAR-FÁRMACO

Para enlazar los compuestos citotóxicos o un derivado de estos de la presente invención al agente de unión celular, el compuesto citotóxico puede comprender un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este, por ejemplo el compuesto **14** (ejemplo 1), **23** (ejemplo 2), **35** (ejemplo 3), **49** (ejemplo 4), **80** (ejemplo 5), **90** (ejemplo 6), **63** (ejemplo 7) o **70** (ejemplo 8). Estos compuestos pueden estar unidos directamente al agente de unión celular. En los ejemplos 11, 13, 14-17, 19 y 20 se describen procesos representativos para enlazar los compuestos citotóxicos que tienen un grupo reactivo unido a estos con el agente de unión celular para producir los conjugados de agente de unión celular-agente citotóxico.

En una modalidad, un reactivo de reticulación bifuncional primero se puede hacer reaccionar con el compuesto citotóxico para proporcionar el compuesto que presenta un resto enlazador

con un grupo reactivo unido a este (es decir, compuesto de fármaco-enlazador), que luego puede reaccionar con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del reactivo de reticulación bifuncional primero puede reaccionar con el agente de unión celular para proporcionar el agente de unión celular que presenta un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este, que luego puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles al ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasa y enlaces lábiles a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces lábiles a peptidasa y tioéter. Otros enlazadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, como los que se describen detalladamente en la publicación estadounidense número 2005/0169933 o enlazadores cargados o

enlazadores hidrofílicos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976, cada uno de los cuales se incorpora expresamente a la presente mediante esta referencia.

En una modalidad, una solución de un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) en amortiguador acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente de reticulación bifuncional, por ejemplo *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El agente de unión celular modificado (p. ej., anticuerpo modificado) luego se hace reaccionar con el compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en la presente, por ejemplo el compuesto **98** o **99** (ejemplos 9 y 10), para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a disulfuro de la presente invención.

En otra modalidad, el compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en la presente, por ejemplo el compuesto **98** o **99**, puede reaccionar con un agente de reticulación bifuncional tal como *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-

succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para formar un compuesto de agente citotóxico-enlazador, que luego puede reaccionar con un agente de unión celular para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a disulfuro de la presente invención. El compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede preparar in situ sin purificación antes de la reacción con el agente de unión celular. Los ejemplos 12 y 18 describen un proceso representativo. Alternativamente, el compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede purificar antes de la reacción con el agente de unión celular.

El conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico se puede purificar utilizando cualquier método de purificación conocido en la técnica, por ejemplo los descritos en la patente estadounidense N.° 7.811.572 y la publicación estadounidense N.° 2006/0182750, ambas de las cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia. Por ejemplo, el conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico se puede purificar utilizando filtración de flujo tangencial, cromatografía de

adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, filtración de no adsorción o combinación de estos. Preferentemente, se utiliza filtración de flujo tangencial (TFF, también llamada filtración de flujo cruzado, ultrafiltración y diafiltración), y/o resinas de cromatografía de adsorción para la purificación de los conjugados.

Alternativamente, el agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) se puede incubar con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como 2-iminotiolano, L-homocisteína tiolactona (o derivados) o N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) para introducir grupos sulfidrilo. El anticuerpo modificado luego se hace reaccionar con el agente citotóxico que contiene disulfuro adecuado para producir un conjugado de anticuerpo-agente citotóxico unido a disulfuro. El conjugado anticuerpo-agente citotóxico luego se puede purificar a través de los métodos descritos anteriormente. El agente de unión celular también se puede modificar para introducir restos tiol, por ejemplo los anticuerpos modificados con cisteína descritos en las patentes estadounidenses N.° 7.772485 y 7,855.275.

En otra modalidad, una solución de un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) en amortiguador acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como *N*-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato para introducir grupos maleimido, o con *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. El agente de unión celular modificado (p. ej., anticuerpo modificado) luego se hace reaccionar con el agente citotóxico que contiene tiol para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a tioéter. El conjugado luego se puede purificar a través de los métodos descritos anteriormente.

El número de moléculas citotóxicas unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar de forma espectrofotométrica mediante la medición de la proporción de la absorbancia en 280 nm y 330 nm. Un promedio de 1-10 compuestos citotóxicos/moléculas de anticuerpo se puede unir a través de los métodos descritos en la presente. El número promedio preferido de compuestos citotóxicos unidos por molécula de anticuerpo es 2-5 y el más preferido es 2,5-4,0.

En 8.765.740 y la publicación de solicitud estadounidense N.° 2012/0238731 se describen procesos representativos para preparar los conjugados de agente de unión celular-fármaco de la presente invención. Los principios completos de estas referencias se incorporan a la presente mediante esta referencia.

CITOTOXICIDAD DE COMPUESTOS Y CONJUGADOS

Se pueden evaluar los compuestos citotóxicos y los conjugados de agente de unión celular-fármaco de la invención en cuanto a su capacidad de suprimir la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer *in vitro.* Por ejemplo, se pueden utilizar líneas celulares tales como línea celular KB del carcinoma cervical humano, línea celular THP-1 de leucemia monocítica aguda humana, línea celular HL60 de leucemia promielocítica humana, línea celular HNT-34 de leucemia mieloide aguda humana, para la evaluación de citotoxicidad de estos compuestos y conjugados. Las células que se evaluarán se pueden exponer a los compuestos o los conjugados durante 1-5 días y las fracciones supervivientes de células se pueden medir en ensayos directos a través de los métodos conocidos. Se pueden calcular

los valores de IC_{50} a partir de los resultados de los ensayos. Además o alternativamente, se puede utilizar un ensayo de sensibilidad de línea celular *in vitro*, como el que describe el Instituto Nacional del Cáncer de EUA (véase Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239, que se incorpora a la presente mediante esta referencia) como una de las guías para determinar los tipos de cáncer que pueden ser sensibles al tratamiento con los compuestos o conjugados de la invención.

En las figuras 2 y 4 se muestran ejemplos de potencia *in vitro* y especificidad diana de los conjugados de anticuerpo-agente citotóxico de la presente invención. Todos los conjugados son extremadamente citotóxicos en las células cancerosas positivas del antígeno con un IC_{50} en el intervalo picomolar bajo. Las líneas celulares negativas del antígeno permanecen viables cuando se exponen a los mismos conjugados.

En un ejemplo, se midió la eficacia *in vivo* de un conjugado de agente de unión celular/agente citotóxico. Se trataron ratones SCID que poseían células tumorales NCI-H2110 con conjugados huMov19-**80** y huMov19-**90** y se observó una regresión tumoral

significativa en múltiples dosis mientras que los ratones no tratados aumentaron los tumores rápidamente (figura 6). Se observó la actividad para el conjugado huMov19-**90** en dosis tan bajas como 5 µg/kg.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO

La presente invención incluye una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende los compuestos de benzodiazepina novedosos descritos en la presente (p. ej., indolinobenzodiazepina o oxazolidinobenzodiazepina), derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable). La presente invención también incluye una composición (p. ej., una composición farmacéutica) que comprende los compuestos de benzodiazepina novedosos descritos en la presente, derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador (un portador farmacéuticamente aceptable) que además comprende un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano).

Las presentes composiciones también son útiles para tratar la depresión, la ansiedad, el estrés, las fobias, el pánico, la disforia, trastornos psiquiátricos, el dolor y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., un ser humano).

La presente invención incluye un método para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano) que comprende administrarle a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de benzodiazepina novedosos descritos en la presente (p. ej., indolinobenzodiazepina o oxazolidinobenzodiazepina), derivados de estos o conjugados de estos (y/o solvatos y sales de estos) o una composición de estos, solos o combinados con un segundo agente terapéutico.

La presente invención también proporciona métodos de tratamiento que comprenden administrarle a un sujeto que necesite el tratamiento una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados descritos arriba.

De modo similar, la presente invención proporciona un método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprenden poner en contacto células diana o

tejido que contiene células diana con una cantidad eficaz de un agente citotóxico que comprende cualquiera de los compuestos citotóxicos-agentes de unión celular (p. ej., dímero de indolinobenzodiazepina o oxazolidinobenzodiazepina unido a un agente de unión celular) de la presente invención, una sal o solvato de estos. Las células diana son células a las cuales el agente de unión celular se puede unir.

Si se desea, se pueden administrar otros agentes activos, como otros agentes antitumorales, junto con el conjugado.

Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son conocidos y se pueden determinar por los entendidos en la técnica según lo requiera la situación clínica.

Algunos ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7,4, que contiene o que no contiene entre aproximadamente 1 mg/mL y 25 mg/mL de albúmina de suero humano, (2) 0,9 % de solución salina (0,9 % p/v NaCl) y (3) 5 % de (p/v) dextrosa; y también puede contener un antioxidante como triptamina y un agente estabilizante como

Tween 20.

El método para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas se puede llevar a la práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Algunos ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir los linfocitos T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto para las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para destruir las variantes que expresan un antígeno no deseado.

Las condiciones de uso *in vitro* no clínicas se pueden determinar fácilmente por un entendido en la técnica.

Algunos ejemplos de uso clínico *ex vivo* son la remoción de células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o la remoción de linfocitos T y otras células linfoides de un tejido o de la

médula ósea autóloga o alogénica antes del trasplante para prevenir la GVHD. El tratamiento se puede realizar del siguiente modo. Se recoge la médula ósea del paciente u otro individuo y se incuba en medio que contiene suero al cual se le añade el agente citotóxico de la invención, las concentraciones oscilan entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 1 pM, durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 °C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, se determinan fácilmente por un entendido en la técnica. Después de la incubación, se lavan las células de la médula ósea con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por vía intravenosa de acuerdo con los métodos conocidos. En los casos en los que el paciente recibe otro tratamiento como un ciclo de quimioterapia ablativa o irradiación corporal total entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido utilizando equipos médicos estándar.

Para el uso clínico *in vivo*, se suministrará el agente

citotóxico de la invención como una solución o un polvo liofilizado que se evalúa en cuanto a la esterilidad y los niveles de endotoxina. A continuación se presentan algunos ejemplos de protocolos de administración de los conjugados adecuados. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis en bolo se administran en 50 a 1000 mL de solución salina normal a la cual se le puede añadir entre 5 y 10 mL de albúmina de suero humano. Las dosificaciones serán de entre 10 μg y 2000 mg por administración, por vía intravenosa (intervalo de entre 100 ng y 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede seguir recibiendo el tratamiento de forma semanal. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, los excipientes, los diluyentes, las dosificaciones, los momentos, etc., se pueden determinar por los entendidos en la técnica según lo requiera la situación clínica.

Algunos ejemplos de afecciones médicas que se pueden tratar de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de la inducción de la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas

incluyen neoplasias malignas de cualquier tipo incluido, por ejemplo, el cáncer, enfermedades autoinmunitarias, como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazo de trasplantes, como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones virales, como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones por parásitos, como giardiasis, amoebiasis, esquistosomiasis y otras, según lo determinado por un entendido en la técnica.

Las terapias contra el cáncer y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en textos como Physician's Desk Reference (PDR). La PDR describe dosificaciones de los agentes que se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores conocidos para el médico entendido en la técnica y se pueden

determinar por el médico. El contenido de la PDR se incorpora expresamente a la presente en su totalidad mediante esta referencia. El entendido en la técnica puede revisar la PDR, utilizando uno o más de los siguientes parámetros, para determinar el régimen de dosificación y las dosificaciones de los agentes quimioterapéuticos y los conjugados que se pueden utilizar de acuerdo con los principios de la presente invención. Estos parámetros incluyen:

Índice integral

Por el fabricante

Productos (por nombre de la empresa o marca comercial del fármaco)

Índice de categoría

Índice genérico/químico (nombres comunes de fármacos que no son marcas)

Imágenes a color de los medicamentos

Información del producto coherente con el etiquetado de la FDA

Información química

Función/acción

Indicaciones y contraindicaciones

Investigación de ensayo, efectos secundarios, advertencias

ANÁLOGOS Y DERIVADOS

El entendido en la técnica de los agentes citotóxicos comprenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente se puede modificar de modo tal que el compuesto resultante aún mantenga la especificidad y/o la actividad del compuesto de partida. El entendido en la técnica también comprenderá que muchos de estos compuestos se pueden utilizar en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente. Por lo tanto, los agente citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente.

Todas las referencias citadas en la presente y en los ejemplos que siguen se incorporan expresamente en su totalidad mediante esta referencia.

EJEMPLOS

A continuación será ilustrada la invención mediante la referencia a ejemplos no taxativos. A menos que se establezca lo contrario, todos los porcentajes, proporciones, partes, *etc*.

son en peso. Todos los reactivos se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Nueva Jersey, u otras fuentes comerciales. Se adquirieron espectros resonancia magnética nuclear (^{1}H NMR) en un instrumento Bruker 400 MHz. Se adquirieron espectros de masa en un instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 y se adquirieron LCMS en un LC Agilent 1260 Infinity con un MS cuadrupolo simple de Agilent 6120 utilizando ionización por electroaspersión.

Los siguientes disolventes, reactivos, grupos protectores, restos y otras designaciones se pueden denominar por sus abreviaturas entre paréntesis:

Me = metilo; Et = etilo; Pr = propilo; *i*-Pr = isopropilo; Bu = butilo; *t*-Bu = terc-butilo; Ph = fenilo y Ac = acetilo

AcOH o HOAc = ácido acético

ACN orCH_3CN = acetonitrilo

Ala = alanina

ac.: acuoso

$BH_3 \cdot DMS$ = complejo de dimetilsulfuro borano

Bn = bencilo

Boc o BOC = terc-butoxicarbonilo

CBr_4 = carbontetrabromuro

Cbz o Z = benciloxicarbonilo

DCM o CH_2Cl_2 = diclorometano

DCE = 1,2-dicloroetano

DMAP = 4-dimetilaminopiridina

agua DI = agua desionizada

DIBAL = hidruro de diisobutilaluminio

DIEA o DIPEA = N,N-diisopropiletilamina

DMA = N,N-dimetilacetamida

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

DTT = ditiotreitol

EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EEDQ = N-Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina

ESI o ES = ionización por electroaspersión

EtOAc = etilacetato

Gly = glicina

g = gramos

h = hora

HATU = N,N,N'N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio

hexafosfato

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

HOBt o HOBT = 1-hidroxibenzotriazol

LAH = hidruro de litio y aluminio

LC = cromatografía líquida

LCMS = espectrometría de masas por cromatografía líquida

min = minutos

mg = miligramos

mL = mililitros

mmol = milimoles

µg = microgramos

µL = microlitros

µmol = micromoles

Me = metilo

MeOH = metanol

MeI = metilyoduro

MS = espectrometría de masas

MsCl = cloruro de metanosulfonilo (cloruro de mesilo)

Ms_2O = anhídrido metanosulfónico

$NaBH(OAc)_3$ = triacetoxiborohidruro de sodio

NHS = N-hidroxisuccinamida

NMR = espectroscopia de resonancia magnética nuclear

PPh_3 = trifenilfosfina

PTLC = cromatografía de capa fina preparativa

rac = mezcla racémica

R_f = factor de retardo

RPHPLC o RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa

TA o ta = temperatura ambiente (ambiente, aproximadamente 25 °C)

sat. = saturado

STAB = triacetoxiborohidruro de sodio ($NaBH(OAc)_3$)

TBSCl o TBDMSCl = cloruro de *terc*-butildimetilsililo

TBS = *terc*-butildimetilsililo

TCEP·HCl = sal de clorhidrato de *tris*(2-carboxietil)fosfina

TEA = trietilamina (Et_3N)

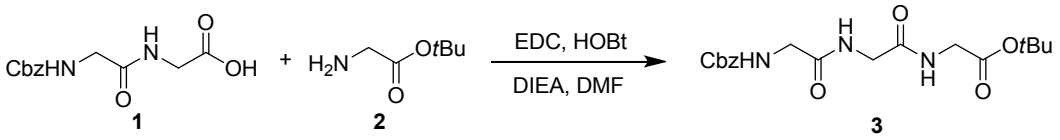
TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

TLC = cromatografía de capa fina

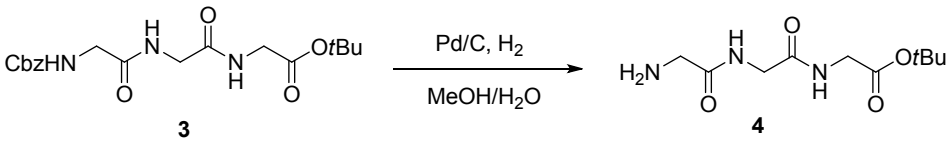
Val = valina

Ejemplo 1. Síntesis de 6-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo



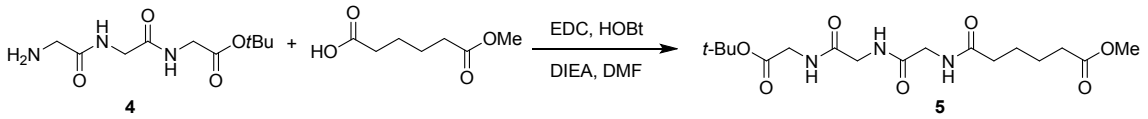
Etapa 1: Se disolvieron Z-Gly-Gly-OH compuesto **1** (5,0 g, 18,78 mmol) y H-Gly-O*t*-Bu·HCl compuesto **2** (3,46 g, 20,66 mmol) en DMF (37,6 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,96 g, 20,66 mmol) y HOBt (2,88 g, 18,78 mmol) al matraz de reacción seguido de DIPEA (8,18 mL, 46,9 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente en Ar durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2, se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat. seguido de agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 5 %) para proporcionar el

compuesto puro **3** como un sólido blanco (6,35 g, el 89 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,18-8,13 (m, 2H), 7,48 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,37-7,36 (m, 3H), 7,34-7,32 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 4,09 (q, 1H, *J* = 5,2 Hz), 3,74 (t, 4H, *J* = 6,1 Hz), 3,67 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,17 (d, 2H, *J* = 5,2 Hz), 1,41 (s, 9H). LCMS = 4,28 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 324,15 (M-*t*-Bu+H).



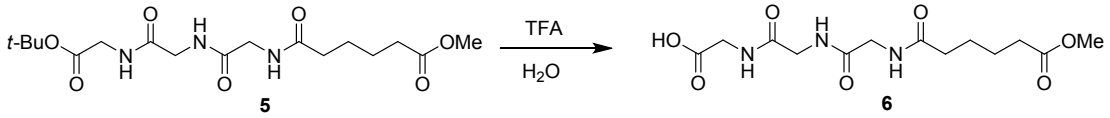
Etapa 2: Se disolvió el compuesto **3** (6,3 g, 16,60 mmol) en MeOH (52,7 mL) y agua (2,64 mL). La mezcla de reacción se purgó con Ar y se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (húmedo, 10 %) (0,884 g, 0,830 mmol). Luego se burbujeó en H_2 de un balón durante 1 min. La reacción se agitó en un balón de H_2 a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. Se agregó CH_3CN (20 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener un sólido pegajoso. El residuo se suspendió en

EtOAc/hexanos (2:1, 50 mL), se filtró y se enjuagó con EtOAc/hexanos (1:1, 30 mL). El sólido se secó al vacío/N_2 durante 1 h para obtener el compuesto **4** como un sólido blanco (3,66 g, 90 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,21-8,18 (m, 1H), 8,12 (bs, 1H), 3,76 (bs, 2H), 3,73 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,13 (s, 2H), 1,93 (bs, 2H), 1,41 (s, 9H).

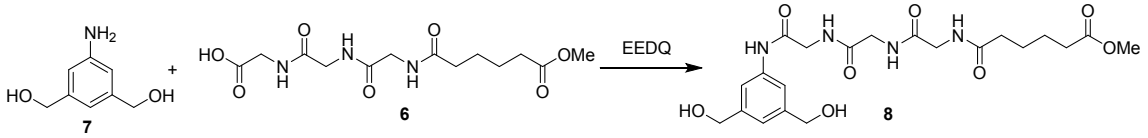


Etapa 3: se disolvieron amina compuesto **4** (1,0 g, 4,08 mmol) y monometiladipato (664 µL, 4,48 mmol) en DMF (13,59 mL). Se agregaron EDC·HCl (860 mg, 4,48 mmol) y HOBt (624 mg, 4,08 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (1,424 mL, 8,15 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (20 mL, 5:1) y se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente, entre el 0 % y el

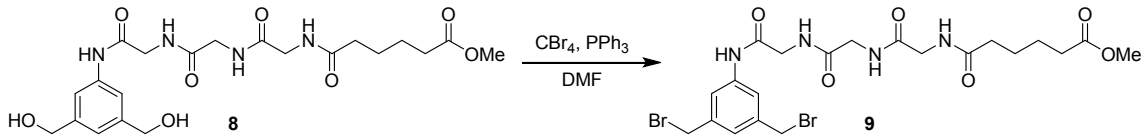
20 % de MeOH/DCM) para proporcionar el compuesto puro **5** como un sólido blanco (1,5 g, el 95% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,17-8,06 (m, 3H), 3,74-3,71 (m, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,32 (bt, 2H, *J* = 6,9 Hz), 2,14 (bt, 2H, *J* = 6,7 Hz), 1,52-1,49 (m, 4H), 1,41 (s, 9H).



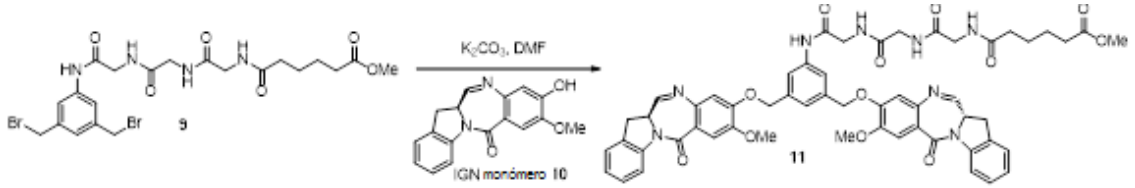
Etapa 4: El compuesto **5** (1,5 g, 3,87 mmol) se agitó en TFA (5,97 mL, 77,0 mmol) y agua desionizada (300 µL) a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó CH_3CN (10 mL) a la mezcla de reacción y se agitó durante 5 min. La mezcla se volvió espesa con lotes de precipitado blanco. Se agregó más CH_3CN (30 mL) y se agitó adicionalmente durante 5 min. La mezcla se filtró y se secó al vacío/N_2 durante 1 h para obtener el compuesto puro **6** como un sólido blanco (0,7 g, 55% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 12,56 (s, 1H), 8,16-8,06 (m, 3H), 3,73 (dt, 6H, *J* = 8,6, 6,1 Hz), 3,59 (s, 3H), 2,32-2,29 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H), 1,51 (bt, 4H, *J* = 3,5 Hz).



Etapa 5: Se suspendieron anilina compuesto **7** (100 mg, 0,653 mmol) y ácido compuesto **6** (227 mg, 0,685 mmol) en CH_2Cl_2/MeOH (4,35 mL/2,2 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (323 mg, 1,306 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc (15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron con EtOAc (2 x 15 mL) y se secó al vacío/N_2 para obtener el compuesto **8** como un sólido blanco (260 mg, el 85 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 9,74 (s, 1H), 8,21-8,19 (m, 2H), 8,11-8,08 (m, 1H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, *J* = 5,7 Hz), 4,45 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz), 3,87 (d, 2H, *J* = 5,8 Hz), 3,75 (dd, 4H, *J* = 5,7, 13,4 Hz), 3,58 (s, 3H), 2,31-2,27 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H),1,52-1,48 (m, 4H). LCMS = 0,886 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 489,3 (M+Na).

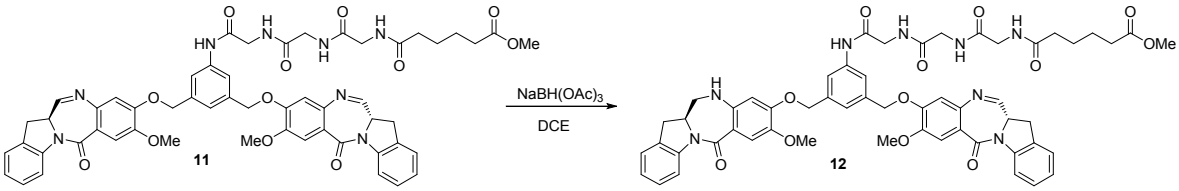


Etapa 6: se disolvieron diol compuesto **8** (260 mg, 0,557 mmol) y carbontetrabromuro (555 mg, 1,672 mmol) en DMF (5,57 mL). Se agregó trifenilfosfina (439 mg, 1,672 mmol) y la mezcla marrón se agitó en Ar a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1, 30 mL) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, entre el 0 % y el 10 %, gradiente) para obtener el compuesto **9** como un sólido amarillo. El producto se suspendió en CH_2Cl_2/EtOAc (1:10, 30 mL) y luego se filtró. El sólido se lavó con EtOAc y se secó al vacío/N_2 para proporcionar el compuesto puro **9** como

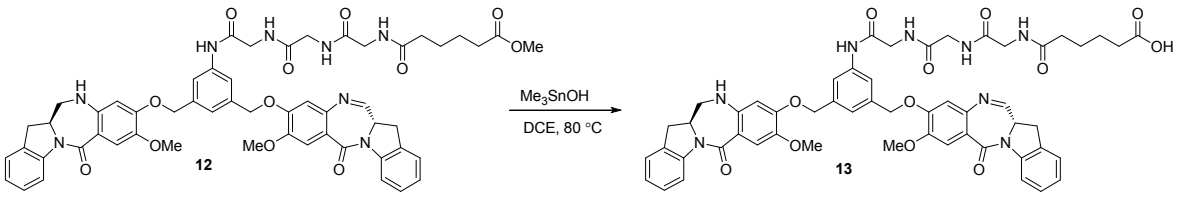


(d, 2H, *J* = 5,8 Hz), 3,77 (dd, 4H, *J* = 5,7, 7,4 Hz), 3,58 (s, 3H), 2,31-2,27 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H), 1,51-1,49 (m, 4H). LCMS = 3,335 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 593,2 (M+H).

Etapa 7: Se disolvieron dibromuro compuesto **9** (109 mg, 0,184 mmol) y monómero IGN compuesto **10** (119 mg, 0,405 mmol) en DMF (1,84 mL). Se agregó carbonato de potasio (63,6 mg, 0,460 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó agua (20 mL) a la mezcla de reacción para precipitar el producto. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se filtró y se secó al vacío/N_2 durante 1 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice ($MeOH/CH_2Cl_2$, gradiente, entre el 0 % y el 5 %) para obtener el compuesto **11** como un sólido amarillo (160 mg, el 60 % de rendimiento, el 70 % de pureza). LCMS = 5,240 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1019,7 (M+H).

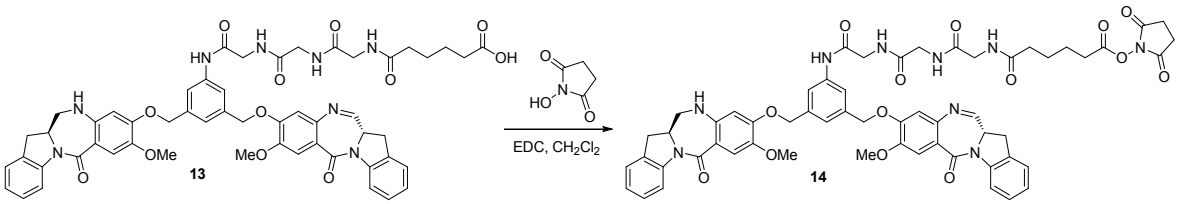


Etapa 8: Se disolvió diimina compuesto **11** (140 mg, 0,11 mmol) en 1,2-dicloroetano (1,1 mL). Se añadió $NaBH(OAc)_3$ (23,29 mg, 0,11 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (30 mL) y se inactivó con solución acuosa de NH_4Cl sat. (15 mL). Las capas se separaron y se lavó con salmuera, se secó en Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH_3CN/H_2O, gradiente, entre el 35 % y el 55 %) para proporcionar monoimina compuesto **12** como un sólido esponjoso blanco (33 mg, el 29 % de rendimiento) y también se recuperó el material de partida compuesto **11** (25 mg). LCMS = 7,091 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1021,7 (M+H).



Etapa 9: Se disolvió metiléster compuesto **12** (33 mg, 0,029 mmol) en THF (1,09 mL) y agua (364 µL). Se agregó LiOH (6,97 mg, 0,291 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O

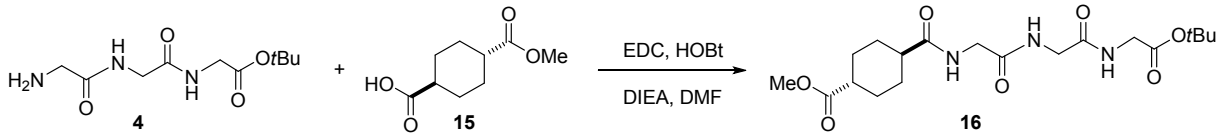
(5 mL) y se acidificó con 0,5 M de HCl ac. hasta pH~4. La capa acuosa se extrajo con CH_2Cl_2/MeOH (3:1, 3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron para obtener el compuesto bruto **13** como un sólido amarillo (29 mg, el 99 % de rendimiento). LCMS = 5,356 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1007,7 (M+H).



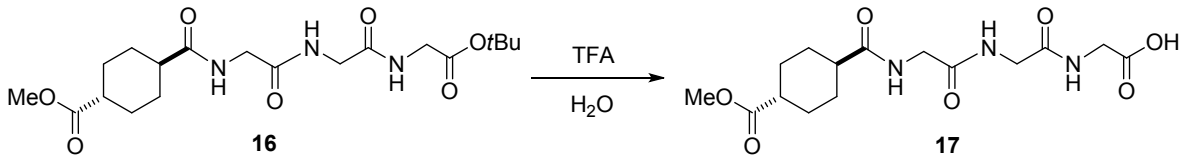
Etapa 10: Se agregó EDC·HCl (22,08 mg, 0,115 mmol) a una solución agitada de ácido compuesto **13** (29 mg, 0,023 mmol) y N-hidroxisuccinamida (21,21 mg, 0,184 mmol) en CH_2Cl_2 (2,3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua (1 x 15 mL) y salmuera (1 x 15 mL). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH_3CN/H_2O, gradiente, entre el 35 % y el 55 %). Se combinaron fracciones que

contenían el producto y se liofilizaron para obtener 6-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoatode 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **14** como un sólido esponjoso blanco (8 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,867 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1104,7 (M+H).

Ejemplo 2. Síntesis de 4-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)ciclohexan-carboxilato de (1r,4r)-2,5-

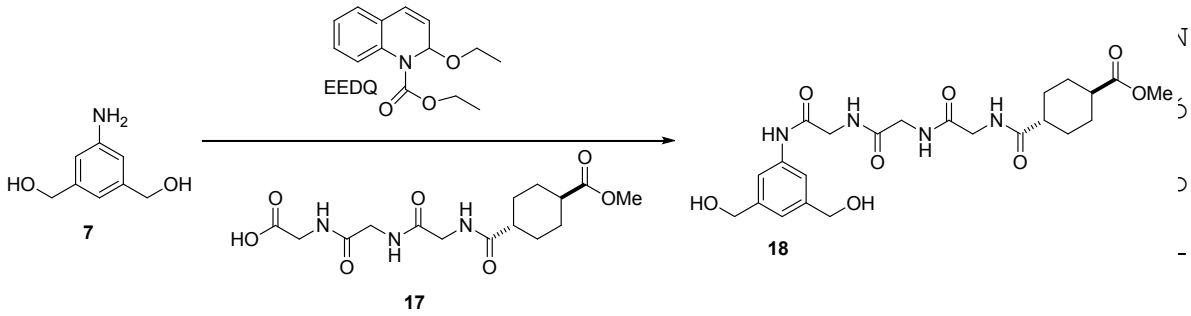


Etapa 1: Se disolvieron amina compuesto **4** (200 mg, 0,815 mmol) y monometiléster de ácido 1,4-*trans*-ciclohexandicarboxílico compuesto **15** (182 mg, 0,978 mmol) en DMF (2,72 mL). Se agregaron EDC·HCl (188 mg, 0,978 mmol) y HOBt (125 mg, 0,815 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (285 µL, 1,631 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat., salmuera y agua. La capa orgánica se secó en Na_2SO_4 y se concentró hasta un residuo pegajoso. Se agregó CH_3CN (15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **16** como un polvo blanco seco (300 mg, el 85 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,16 (t, 1H, *J* = 5,9 Hz), 8,04 (dt, 2H, *J* = 5,6, 14,8 Hz), 3,74-3,69 (m, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,31-2,25 (m, 1H), 2,20-2,13 (m, 1H), 1,94-1,91 (m, 2H), 1,82-1,79 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, *J* = 11,7 Hz).



Etapa 2: Se agregaron TFA (1,40 mL, 18,14 mmol) y agua DI

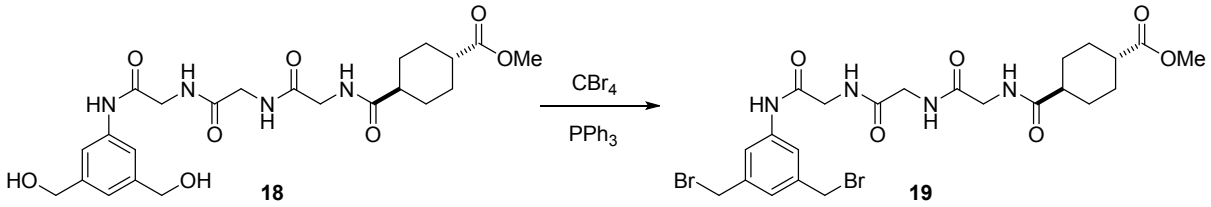
(67,8 µL) al compuesto puro **16** (300 mg, 0,726 mmol) a



d6): δ 8,16-8,13 (m, 1H), 8,07-8,01 (m, 2H), 3,76-3,73 (m, 4H), 3,70 (bd, 2H, *J* = 5,1 Hz), 3,59 (s, 3H), 2,31-2,25 (m, 1H), 2,19-2,14 (m, 1H), 1,94-1,91 (m, 2H), 1,82-1,79 (m, 2H), 1,42-1,26 (m, 4H).

Etapa 3: Se suspendieron anilina compuesto **7** (135 mg, 0,881 mmol) y ácido compuesto **17** (331 mg, 0,925 mmol) en CH_2Cl_2/MeOH (2,9 mL/1,5 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (436 mg, 1,763 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc (15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron

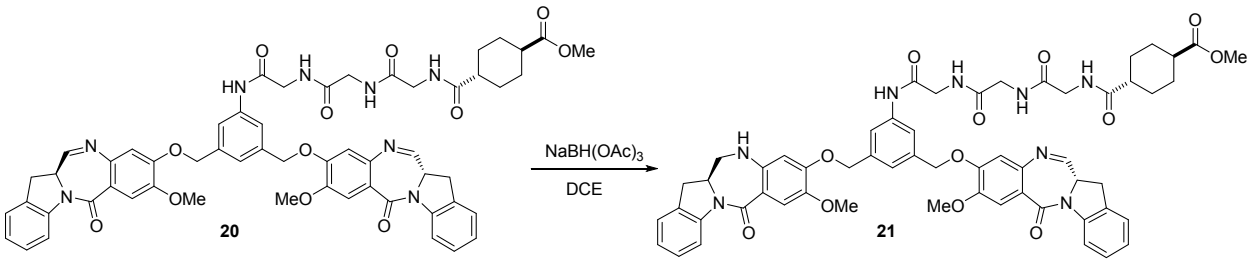
con EtOAc (2 x 15 mL) y se secó al vacío/N_2 para obtener el compuesto **18** como un sólido blanco (330 mg, el 61% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 9,73 (s, 1H), 8,18 (dt, 2H, *J* = 6,0, 19,2 Hz), 8,09-8,01 (m, 2H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, *J* = 5,7 Hz), 4,45 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz), 3,88-3,84 (m, 3H), 3,77-3,69 (m, 8H), 3,63 (s, 2H), 3,59 (s, 6H), 2,30-2,22 (m, 2H), 2,19-2,13 (m, 2H), 1,94-1,90 (m, 4H), 1,82-1,78)m, 4H), 1,41-1,26 (m, 8H).



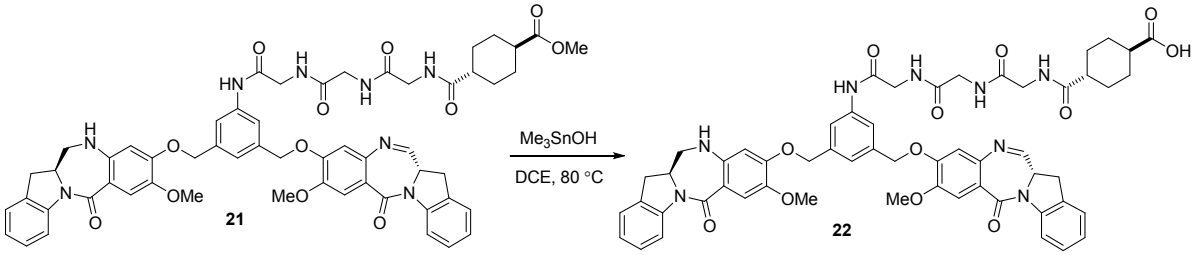
Etapa 4: Se disolvieron el compuesto **18** (330 mg, 0,536 mmol) y CBr_4 (533 mg, 1,608 mmol) en DMF (5,36 mL). Se agregó PPh_3 (422 mg, 1,608 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso amarilla con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice

($MeOH/CH_2Cl_2$, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **19** como un sólido blanco (234 mg, el 64% de rendimiento). LCMS = 4,453 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 617,10 (M+H).

Etapa 5: Se preparó el compuesto **20** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **20** como un sólido amarillo después de la purificación (264 mg, el 60 % de rendimiento). LCMS = 4,831 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 1045,20 (M+H).



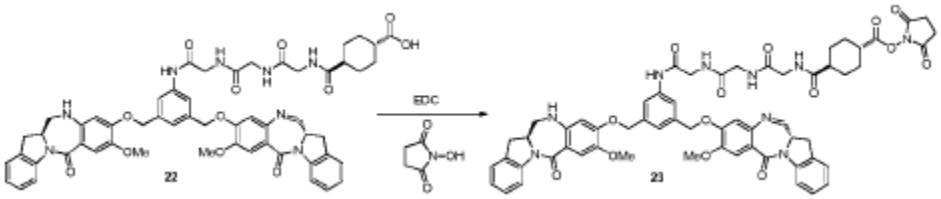
Etapa 6: Se preparó el compuesto **21** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **21** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (51 mg, el



31 % de rendimiento). LCMS = 5,127 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 1047,30 (M+H).

Etapa 7: Se disolvió metiléster compuesto **21** (48 mg, 0,046 mmol) en 1,2-dicloroetano (3,06 mL). Se agregó trimetilestananol (124 mg, 0,688 mmol) a la mezcla de reacción y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (15 mL). La capa acuosa se acidificó a pH ~ 4 con 1 M de HCl. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2/MeOH (10:1, 3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El residuo bruto se tapó a través de una almohadilla corta de gel de sílice y se enjuagó con CH_2Cl_2/MeOH (10:1, luego 5:1, 2 x 30 mL) y se concentró. Se obtuvo el ácido compuesto **22** como un sólido amarillo y se usó en el siguiente paso sin purificación adicional (48 mg, el 100 % de rendimiento). LCMS = 5,338 min (método de 15 min).

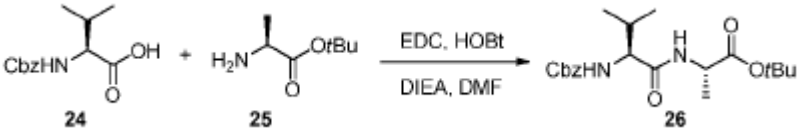
Masa observada (ESI$^+$): 1033,7 (M+H).



Etapa 8: Se preparó el compuesto **23** de forma similar al compuesto **13** en el ejemplo 1. 4-((2-((2-((2-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)ciclohexanocarboxilato de (1r,4r)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **23** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 19 % de rendimiento). LCMS = 6,007 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 1130,8 (M+H).

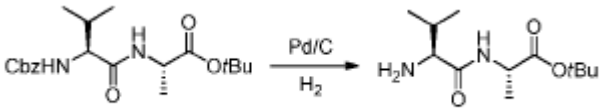
Ejemplo 3. Síntesis de 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12, 12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-

((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **35**)



Etapa 1: Se disolvieron Z-Val-OH compuesto **24** (3,0 g, 11,94 mmol) y L-Ala-O*t*Bu compuesto **25** (1,907 g, 13,13 mmol) en DMF (23,88 mL). Se agregaron EDC·HCl (2,52 g, 13,13 mmol) y HOBt (2,011 g, 13,13 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (4,59 mL, 26,3 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche en Ar. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ sat., NH_4Cl sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 50%) para obtener el compuesto **26** como un sólido blanco (3,68 g, el 81% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

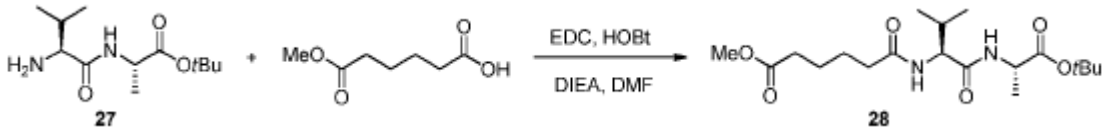
δ 7,39-7,29 (m, 5H), 6,29 (bd, 1H, *J* = 6,9 Hz), 5,34 (bd, 1H, *J* = 8,4 Hz), 5,11 (s, 2H), 4,45 (p, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,02-3,98 (m, 1H), 2,18-2,09 (m, 1H), 1,56 (s, 9H), 1,37 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,93 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz). LCMS = 5,571 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 323,25 (M-*t*Bu+H).



26 **27**

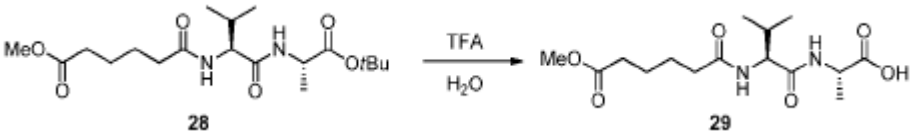
Etapa 2: Se disolvió el compuesto **26** (3,68 g, 9,72 mmol) en MeOH (30,9 mL) y agua (1,543 mL). La solución se purgó con Ar y se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo, 0,517 g) a la mezcla de reacción. Luego se burbujeó H_2 durante un minuto. Se interrumpió el burbujeo y la reacción se agitó en un balón de H_2 durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó la torta con MeOH (30 mL) y se concentró para obtener el compuesto **27** como un sólido blanco (2,35 g, el 99 % de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,79-7,77 (m, 1H), 4,50 (p, 1H, *J* = 7,3 Hz), 3,27 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz), 2,34-2,26

(m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,40 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,01 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,9 Hz).

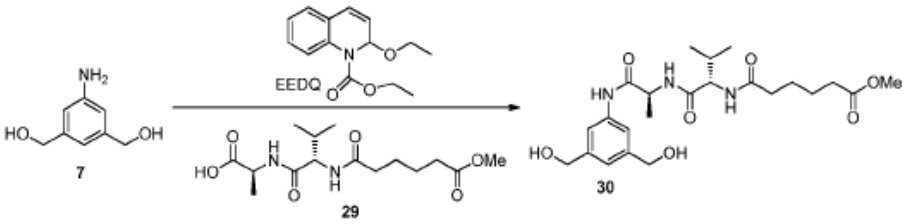


Etapa 3: Se disolvieron amina compuesto **27** (2,35 g, 9,62 mmol) y monometiladipato (1,69 g, 10,58 mmol) en DMF (32,1 mL). Se agregaron EDC·HCl (1,94 g, 10,10 mmol) y HOBt (1,47 g, 9,62 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (3,36 mL, 19,24 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (20 mL, 5:1) y se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 50%) para obtener el compuesto **28** como un sólido blanco (2,77 g, el 75% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,29 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,12 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 4,43(p, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,27 (dd, 1H, *J* = 6,4, 8,6 Hz), 3,66 (s, 3H), 2,35-2,31 (m, 2H), 2,26-2,23 (m, 2H), 2,12-2,03 (m, 1H), 1,70-

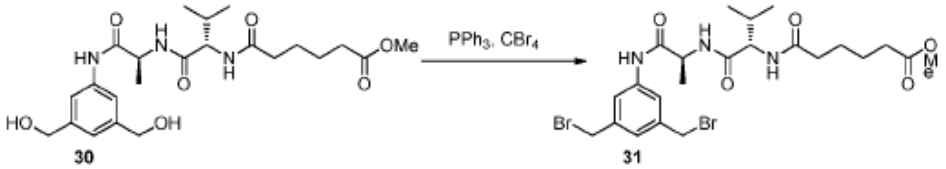
1,63 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,36 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,95 (t evidente, 6H, *J* = 6,6 Hz).



Etapa 4: Se agregaron TFA (8,28 mL, 108,0 mmol) y agua (0,56 mL) al compuesto puro **28** (2,77 g, 7,17 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 h. Se agregó CH_3CN (30 mL) a la mezcla de reacción y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **29** como un sólido amarillo pálido (2,0 g, el 84% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,11 (bs, 1H), 7,29 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 7,14 (d, 1H, 6,8 Hz), 4,58 (p, 1H, *J* = 7,1 Hz), 4,37 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz), 3,68 (s, 3H), 2,37-2,32 (m, 4H), 2,03-1,99 (m, 2H), 1,69-1,63 (m, 4H), 1,49 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz), 0,96 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz).

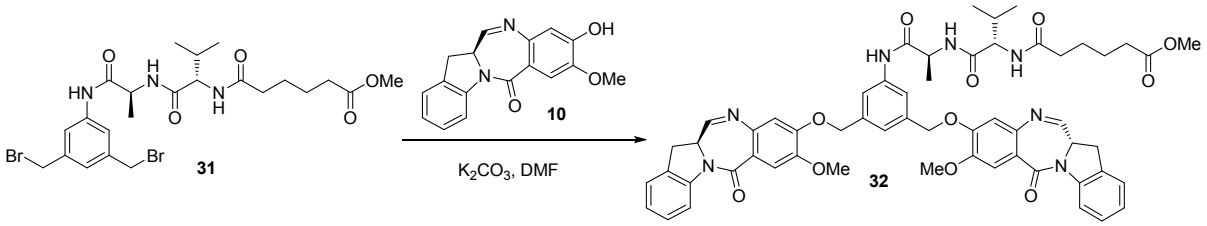


Etapa 5: Se suspendieron anilina compuesto **7** (150 mg, 0,98 mmol) y ácido compuesto **29** (340 mg, 1,03 mmol) en CH_2Cl_2/MeOH (3,26 mL, 1,62 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (484 mg, 1,96 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc/Et_2O (15 mL, 15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron con Et_2O (2 x 15 mL) y se secó al vacío/N_2 para obtener el compuesto **30** como un sólido blanco (150 mg, el 33% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,61 (s, 2H), 7,47 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz), 7,14 (s, 1H), 6,64 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 4,82-4,75 (m, 1H), 4,45-4,40 (m, 4H), 3,64 (s, 3H), 2,36-2,27 (m, 4H), 2,16-2,07 (m, 1H), 1,68-1,59 (m, 4H), 1,47 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 3,6 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz). LCMS = 3,073 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 466,25 (M+H).



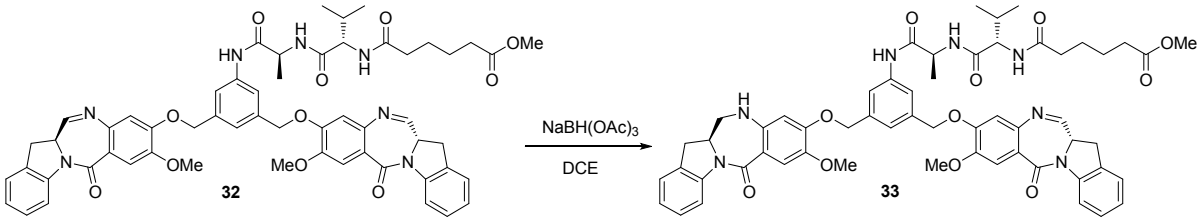
Etapa 6: Se disolvieron diol compuesto **30** (150 mg, 0,322 mmol) y CBr_4 (321 mg, 0,967 mmol) en DMF (3222 µl). Se agregó PPh_3

(254 mg, 0,967 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso roja-rosa con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 100%) para obtener el compuesto **31** como un sólido blanquecino (473 mg, el 75% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz), 7,85 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,64 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,68 (s, 3H), 4,37 (p, 1H, *J* = 7,0 Hz), 4,18 (dd, 1H, *J* = 7,2, 8,4 Hz), 3,58 (s, 3H), 2,32-2,29 (m, 2H), 2,33-2,12 (m, 2H), 2,01-1,91 (m, 1H), 1,53-1,49 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,89 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,85 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz). LCMS = 5,259 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 592,05 (M+H).

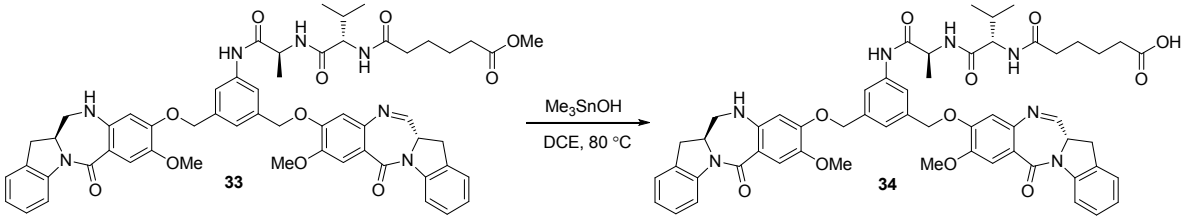


Etapa 7: Se preparó el compuesto **32** de forma similar al

compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **32** como un sólido amarillo después de la purificación (162 mg, el 57% de rendimiento, el 70 % de rendimiento). LCMS = 6,461 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1018,7 (M+H).

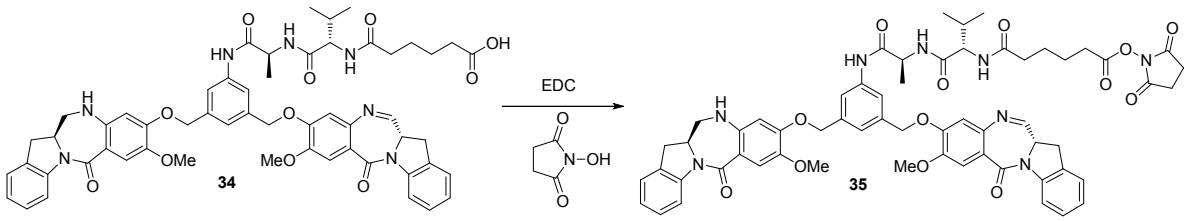


Etapa 8: Se preparó el compuesto **33** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **33** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (40 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,528 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 1020,30 (M+H).



Etapa 9: Se preparó el compuesto **34** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto **34** como un sólido amarillo después de tapón de sílice (38 mg, el 100%

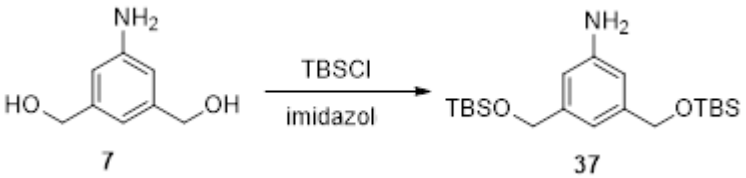
de rendimiento). LCMS = 5,211 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 1006,35 (M+H).



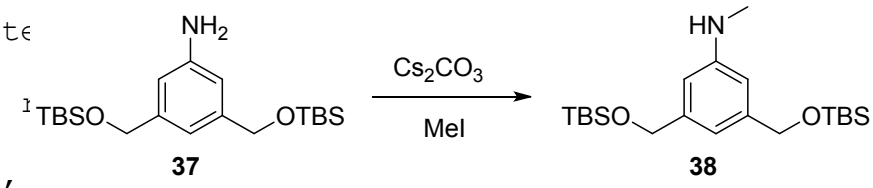
Etapa 10: Se preparó el compuesto **35** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12, 12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **35** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 20 % de rendimiento). LCMS = 7,031 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 1103,7 (M+H).

Ejemplo 4. Síntesis de 2-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-

a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-3,6,9,12-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazaheptadecan-17-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **49**)

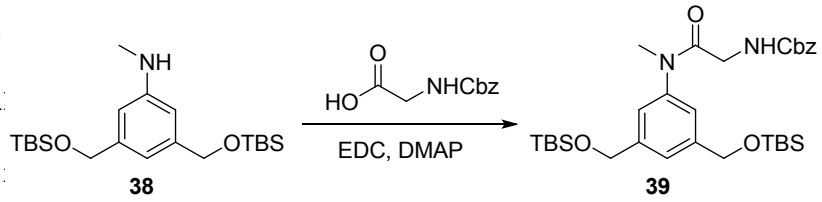


Etapa 1: Se disolvió (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol compuesto **7** (5,0 g, 32,6 mmol) en THF (65,3 mL). Se agregó TBSCl (12,30 g, 82 mmol) e imidazol (6,67 g, 98 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche en Ar. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH_4Cl sat. y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 30%) para obte



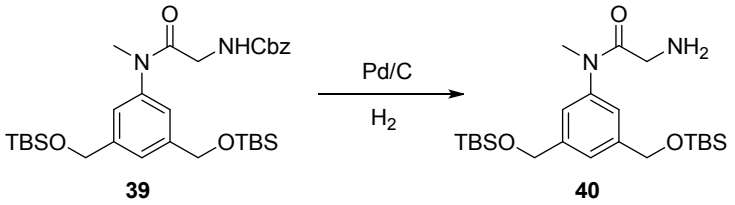
, el 100% de 1 lH), 6,60 (s, .

Etapa 2: Se agregó Cs_2CO_3 (8,54 g, 26,2 mmol) a una solución agitada) en DMF (52,4 m mol) y la reacció 3 h. Se



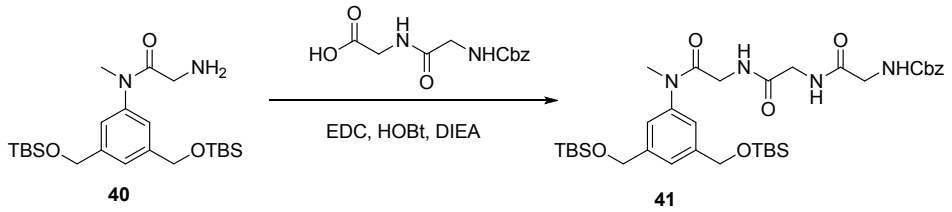
agregaron agua (10 mL) y EtOAc (30 mL) a la mezcla de reacción. Las capas se separaron y se extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas se lavaron con agua (4x), se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el producto monometilado deseado compuesto **38** (3,8 g, el 37 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,63 (s, 1H), 6,52 (s, 2H), 4,67 (s, 4H), 2,84 (s, 3H), 0,94 (s, 18H), 0,10 (s, 12H).

Etapa 3: Se disolvieron anilina compuesto **38** (1,0 g, 2,53 mmol) y Z-Gly-OH (0,582 g, 2,78 mmol) en DMF (8,42 mL). Se agregaron EDC·HCl (1,21 g, 6,32 mmol) y DMAP (340 mg, 2,78 mmol) a la mezcla de reacción y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con $NaHCO_3$ sat. y agua (2x), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 30% y el 100 %) para obtener el compuesto **39** como un sólido pegajoso amarillo (780 mg, el 53% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,27 (m, 6H), 6,90 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,62 (s, 4H), 3,58 (s, 2H), 3,16 (s, 3H), 0,83 (s, 18H), 0,00 (s, 12 H).



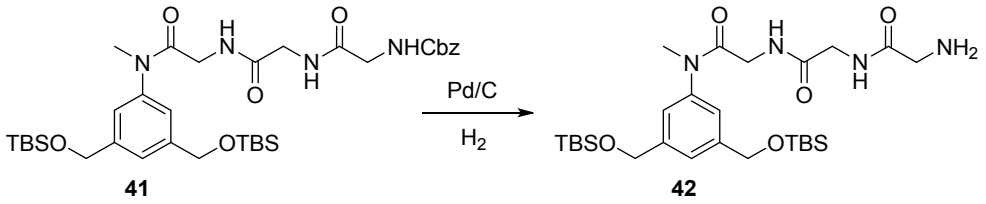
Etapa 4: Se disolvió el compuesto **39** (1,26 g, 2,147 mmol) en MeOH (6,82 mL) y THF (6,8 mL) y la solución se purgó con N_2. Se agregó Pd/C (10 %, 0,228 g, 0,215 mmol) y se burbujeó H_2

durante unos minutos. La reacción se agitó en balón de H_2 durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH y se concentró para proporcionar el compuesto puro **40** (1 g, el 100 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 7,41-7,30 (m, 2H), 7,27-7,21 (m, 1H), 7,06 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 3,23 (s, 3H), 3,12 (s, 2H), 0,82 (s, 18H), 0,00 (s, 12H).



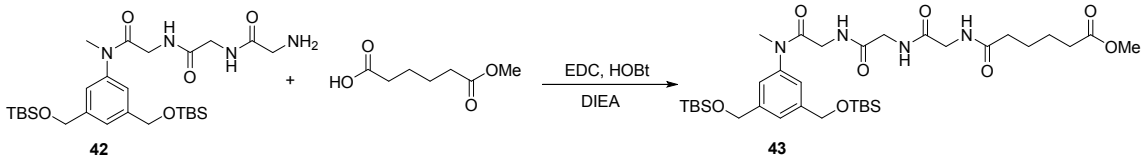
Etapa 5: Se disolvieron amina compuesto **40** (1,0 g, 1,988 mmol) y Z-Gly-Gly-Gly-OH (662 mg, 2,385 mmol) en DMF (6,63 mL). Se agregaron EDC·HCl (457 mg, 2,385 mmol) y HOBT (304 mg, 1,988 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (694 µL, 3,98 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con $NaHCO_3$ sat., salmuera y agua (2x). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice

(MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **41** como una espuma pegajosa blanca (994 mg, el 71% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38-7,32 (m, 7H), 7,31-7,27 (m, 2H), 7,01 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,74 (s, 4H), 3,97 (d, 2H, *J* = 4,6 Hz), 3,92 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz), 3,74 (d, 2H, *J* = 3,7 Hz), 3,27 (s, 3H), 0,94 (s, 18H), 0,11 (s, 12H).



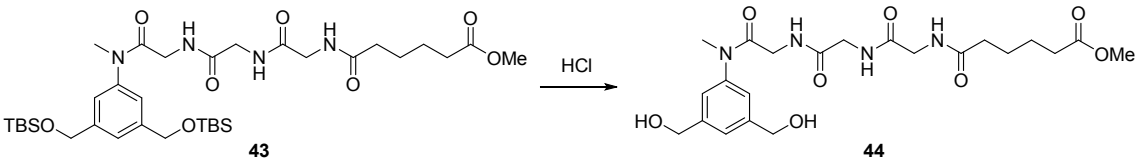
Etapa 6: Se suspendió el compuesto **41** (994 mg, 1,418 mmol) en MeOH (6,65 mL) y agua (443 µL) y se purgó con N_2. Se agregó Pd/C (10 % húmedo, 302 mg, 0,284 mmol) y se burbujeó H_2 durante unos minutos. La reacción se agitó en balón de H_2 durante la noche. La solución se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH y se concentró para obtener el compuesto puro **42** (725 mg, el 90 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,10-7,97 (m, 1H), 7,91-7,85 (m, 1H), 7,31-7,23 (m, 1H), 7,05 (s, 2H), 7,65 (s, 4H), 3,68-3,62 (m, 2H), 3,56-3,45 (m, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,08-3,06 (m, 2H), 3,06-3,03 (m, 2H), 0,82 (s, 18H), 0,00

(s, 12H). LCMS = 5,574 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 567,30 (M+H).

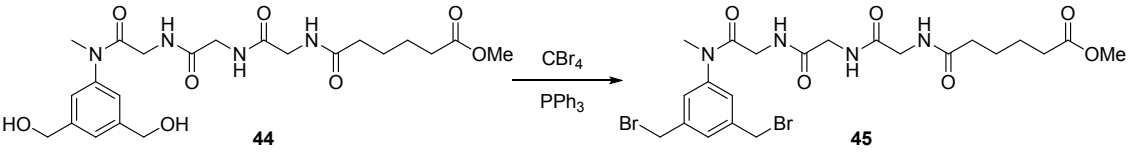


Etapa 7: Se disolvieron amina compuesto **42** (725 mg, 1,279 mmol) y monometiladipato (246 mg, 1,535 mmol) en DMF (6,5 mL). Se agregaron EDC·HCl (294 mg, 1,535 mmol) y HOBt (196 mg, 1,279 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (447 µL, 2,56 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (20 mL) y se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **43** (425 mg, el 33% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,30 (s, 1H), 7,01 (s, 2H), 6,89-6,85 (m, 1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 6,41-6,40 (m, 1H), 4,73 (s, 4H), 3,98-3,96 (m, 4H), 3,74 (bd, 2H, *J* = 3,5 Hz), 3,66 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 2,33 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz), 2,28 (t, 2H, *J* =

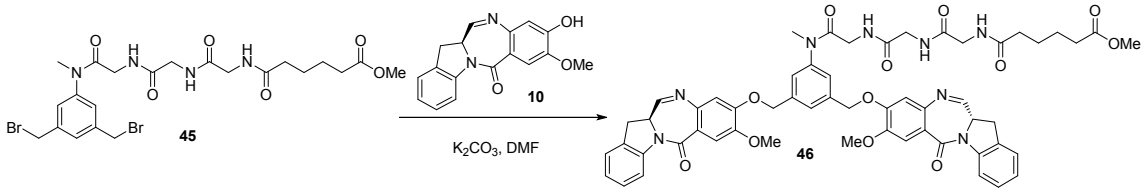
6,5 Hz), 0,94 (s, 18H), 0,11 (s, 12H). LCMS = 7,709 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 709,35 (M+H).



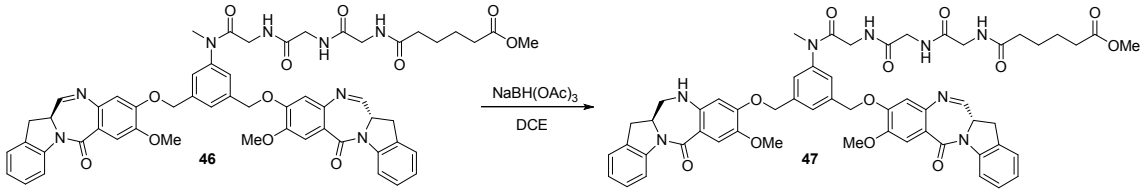
Etapa 8: Se disolvió el compuesto **43** (422 mg, 0,417 mmol) en THF (1,89 mL) y agua (189 µL). Se agregó HCl (acuoso, 5 M) (833 µL, 4,17 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. Se concentró la mezcla de reacción. Se agregó ACN (~ 15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió dos veces más para obtener el compuesto **44** como una espuma blanca (200 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 0,389 min (método de 8 min). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,09-8,04 (m, 2H), 7,93-7,90 (m, 1H), 7,30 (bs, 1H), 7,14 (s, 2H), 4,52 (s, 4H), 3,71-3,68 (m, 4H), 3,58 (s, 3H), 3,17 (bs, 3H), 2,22-2,18 (m, 2H), 2,15-2,12 (m, 2H), 1,53-1,47 (m, 4H).



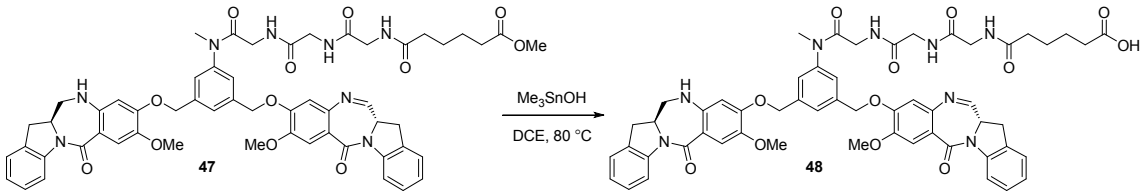
Etapa 9: Se disolvieron diol compuesto **44** (110 mg, 0,229 mmol) y CBr_4 (228 mg, 0,687 mmol) en DMF (2,29 mL). Se agregó PPh_3 (180 mg, 0,687 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso roja-rosa con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 6 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/CH_2Cl_2, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **45** (30 mg, el 22% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,46 (bs, 1H), 7,32-7,26 (m, 2H), 7,26-7,19 (m, 2H), 6,89-6,85 (m, 1H), 4,60 (d, 2H, *J* = 3,6 Hz), 4,48 (d, 2H, *J* = 3,9 Hz), 3,98 (d, 4H, *J* = 5,1 Hz), 3,76 (bs, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,30 (bs, 3H), 2,34 (bt, 2H, *J* = 6,7 Hz), 2,30 (bt, 2H, *J* = 6,6 Hz), 1,70-1,64 (m, 4H). LCMS = 4,326 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 605,10 (M+H).



Etapa 10: Se preparó el compuesto **46** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **46** como un sólido amarillo después de la purificación (40 mg, el 59% de rendimiento). LCMS = 4,751 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 1033,35 (M+H).

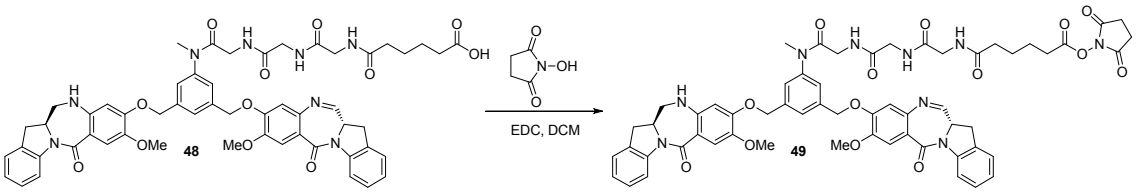


Etapa 11: Se preparó el compuesto **47** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **47** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (14 mg, el 32% de rendimiento). LCMS = 5,857 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 1035,7 (M+H).



Etapa 12: Se preparó el compuesto **48** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto **48** como un sólido amarillo después de tapón de sílice (7 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 4,817 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 1021,35

(M+H).



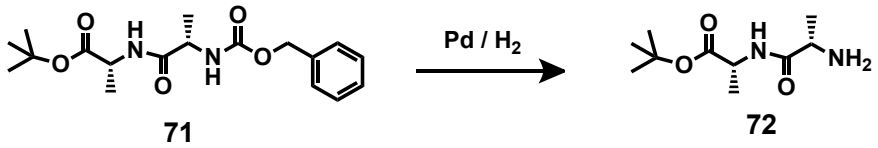
Etapa 13: Se preparó el compuesto **49** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 2-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-3,6,9,12-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazaheptadecan-17-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il, se obtuvo el compuesto **49** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (6,5 mg, el 74 % de rendimiento). LCMS = 5,805 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1118,7 (M+H).

Ejemplo 5. Síntesis de 6-(((S)-1-(((R)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)

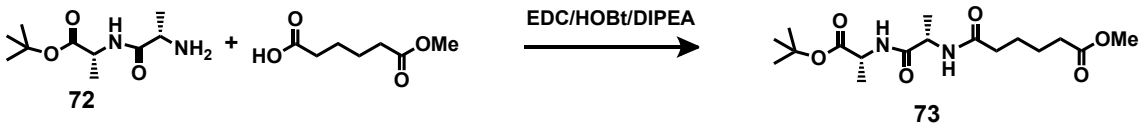
fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **80**)

-

(((benciloxi)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de 2-aminopropanoato (*R*)-*terc*-butilo (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 ml). Se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol) y luego DIPEA (9,75 ml, 56,0 mmol). La reacción se agitó en argón a temperatura ambiente, durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró. El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto bruto **71** (5,6 g, el 71 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,39-7,34 (m, 5H), 6,54 (s, 1H) 5,28 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,47-4,43 (m, 1H), 4,48 (s, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42-1,37 (m, 6H).

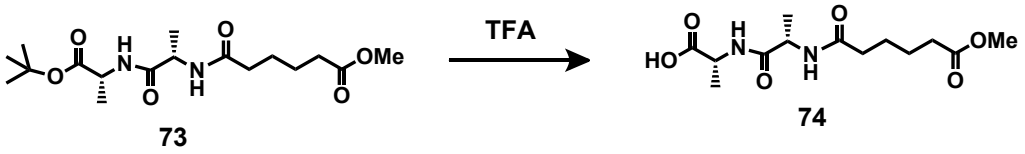


Etapa 2: Se disolvió el compuesto **71** (5,6 g, 15,98 mmol) en metanol (50,7 mL) y agua (2,54 mL). La solución se purgó con argón durante cinco minutos. Se agregó lentamente paladio en carbono (húmedo, 10 %) (0,850 g, 0,799 mmol). La reacción se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró a través de Celite, se enjuagó con metanol y se concentró. El residuo se destiló de forma azeotrópica con metanol y acetonitrilo y el aceite resultante se colocó directamente en el vacío alto para proporcionar el compuesto **72** (3,57 g, el 100 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,67 (s, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,54-3,49 (m, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,40 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).



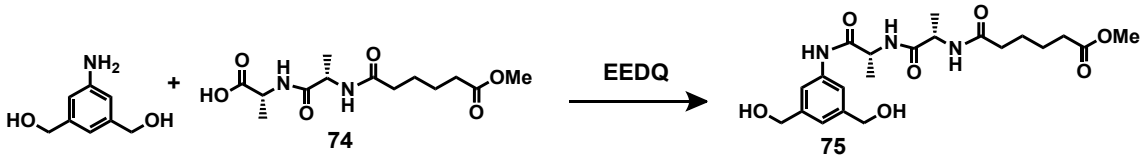
Etapa 3: el compuesto 72 (3,57 g, 16,51 mmol) y

monometiladipato (2,69 mL, 18,16 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (55,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,48 g, 18,16 mmol) y HOBt (2,53 g, 16,51 mmol) seguido de DIPEA (5,77 mL, 33,0 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (80 mL, 5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El compuesto se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo (5x), luego se bombeó en el vacío alto a 35 °C para proporcionar el compuesto **73** (5,91 g, el 100 % de rendimiento). El material bruto se tomó para la etapa siguiente sin purificación. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,67 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 6,22 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,56-4,49 (m, 1H), 4,46-4,38 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,37-2,33 (m, 2H), 2,27-2,24 (m, 2H), 1,70 -1,68 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,40 (s, 3H), 1,38 (s, 3H).



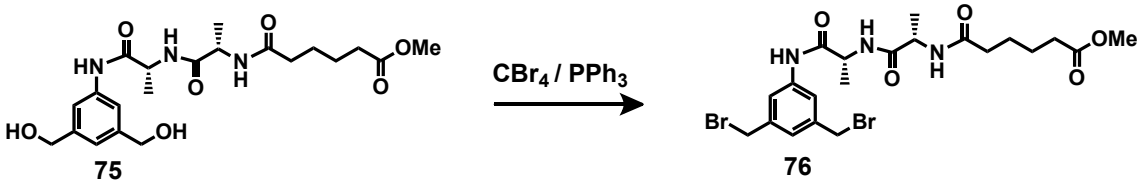
Etapa 4: El compuesto **73** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA

(25,4 mL, 330 mmol) y agua desionizada (1,3 mL) a temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó en vacío alto hasta que se secó para proporcionar el compuesto bruto **74** (4,99 g, el 100 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,44 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz,), 6,97 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 4,81-4,73 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,39-2,32 (m, 2H), 2,31-2,23 (m, 2H), 1,70-1,61 (m, 4H), 1,48(d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,40 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).



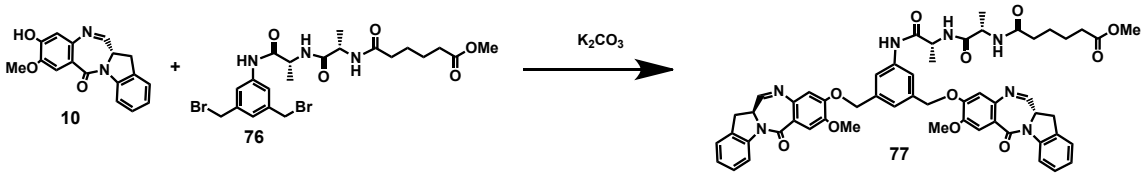
Etapa 5: El compuesto **74** (4,8 g, 15,88 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (101 mL) y metanol anhidro (50,4 mL). Se agregaron (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (2,316 g, 15,12 mmol) y EEDQ (7,48 g, 30,2 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, durante la noche. El disolvente se limpió y el material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **75** (1,65 g, el 25 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*):

δ 9,68 (s, 1H), 8,29 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 8,11 (d, 1H, *J* = 6,4 Hz), 7,52 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,45 (s, 4H), 4,39-4,32 (m, 1H), 4,28-4,21 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,17-2,13 (m, 2H), 1,54-1,45 (m, 4H) 1,30 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,20 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz). MS (m/z): 460,2 $(M + Na)^+$.

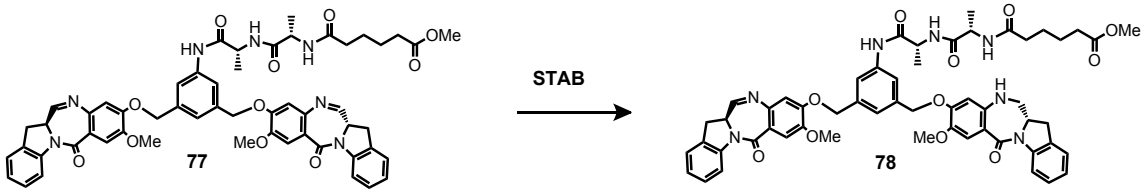


Etapa 6: El Compuesto 75 (0,486 g, 1,111 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,105 g, 3,33 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (11,11 mL). Se agregó trifenilfosfina (0,874 g, 3,33 mmol) y la reacción se agitó en argón durante cuatro horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **76** (250 mg, el 40 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 9,82 (s, 1H), 8,38 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 8,17 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,76 (s, 2H), 7,22 (s, 1H), 4,66 (s, 4H), 4,38-4,31 (m, 1H), 4,25-4,19 (m, 1H), 3,56 (s, 3H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,18-

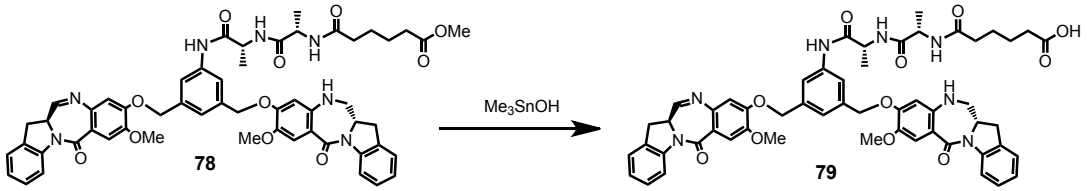
2,15 (m, 2H), 1,53-1,51 (m, 4H), 1,32 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, J = 6,8 Hz).



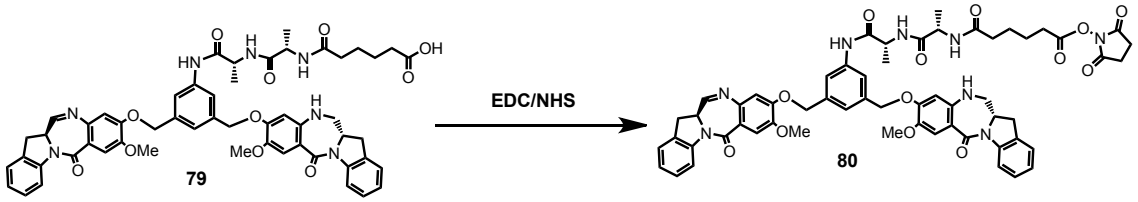
Etapa 7: Se preparó el compuesto **77** de forma similar a **11** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **77** (340 mg, el 60 % de rendimiento, el 77 % de pureza). LCMS = 5,87 min (método de 15 min). MS (m/z): 990,6 $(M + 1)^+$.



Etapa 8: Se preparó el compuesto **78** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **78** (103 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,65 min (método de 15 min). MS (m/z): 992,7 $(M + 1)^+$.



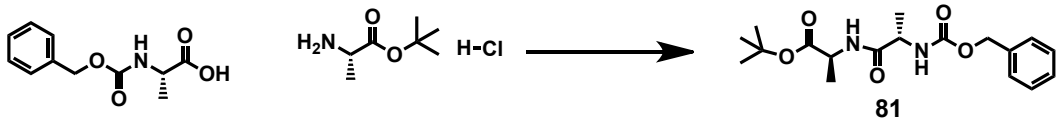
Etapa 9: Se preparó el compuesto **78** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. El material bruto se pasó a través de un tapón de sílice para proporcionar el compuesto **79** (38 mg, el 55 % de rendimiento, el 75 % de pureza). LCMS = 5,83 min (método de 15 min). MS (m/z): 978,6 $(M + 1)^+$.



Etapa 10: Se preparó el compuesto **80** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar 6-(((S)-1-(((R)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-

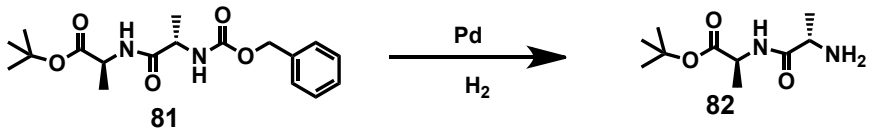
oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **80** (6,5 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,53 min (método de 15 min). MS (m/z): 1075,7 $(M + 1)^+$ y 1097,7$(M + Na)^+$.

Ejemplo 6. Síntesis de 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **90**



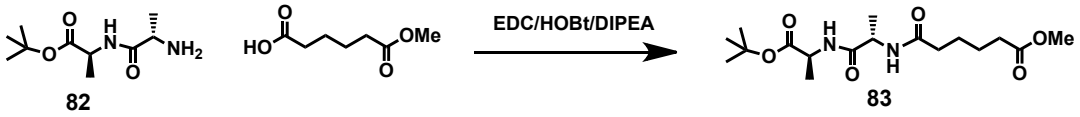
Etapa 1: Se disolvieron ácido (*S*)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de 2-aminopropanoato (*S*)-*terc*-butilo (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 mL). Se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol) y DIPEA (9,75 mL, 56,0 mmol). La reacción se agitó en argón a

temperatura ambiente, durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró. El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto bruto **81** (6,7 g, el 85% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38-7,31 (m, 5H), 6,53-6,42 (m, 1H), 5,42-5,33 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,32-4,20 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 1,38 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).



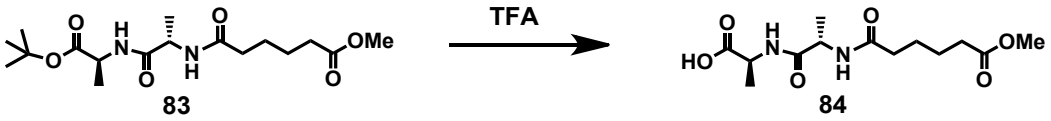
Etapa 2: Se disolvió el compuesto **81** (6,7 g, 19,12 mmol) en metanol (60,7 mL) y agua (3,03 mL). La solución se purgó con argón durante cinco minutos. Se agregó lentamente paladio en carbono (húmedo, 10 %) (1,017 g, 0,956 mmol). La reacción se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La

solución se filtró a través de Celite, se enjuagó con metanol y se concentró. Se destiló de forma azeotrópica con metanol y acetonitrilo y el aceite resultante se colocó directamente en el vacío alto para proporcionar el compuesto **82** (4,02 g, el 97% de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,78-7,63 (m, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 1,73 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).

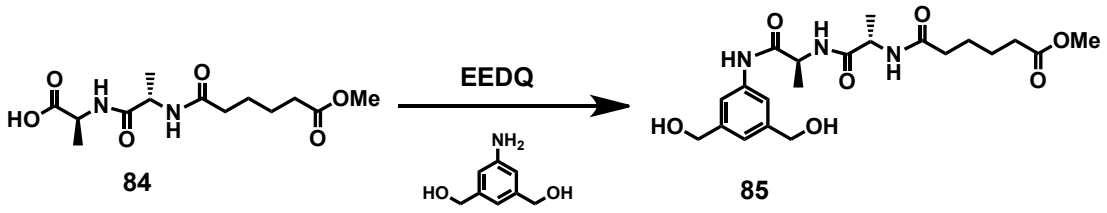


Etapa 3: El Compuesto 82 (4,02 g, 18,59 mmol) y monometiladipato (3,03 mL, 20,45 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (62,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,92 g, 20,45 mmol), HOBt (2,85 g, 18,59 mmol) y DIPEA (6,49 mL, 37,2 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (150 mL, 5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El compuesto se destiló de forma azeotrópica con

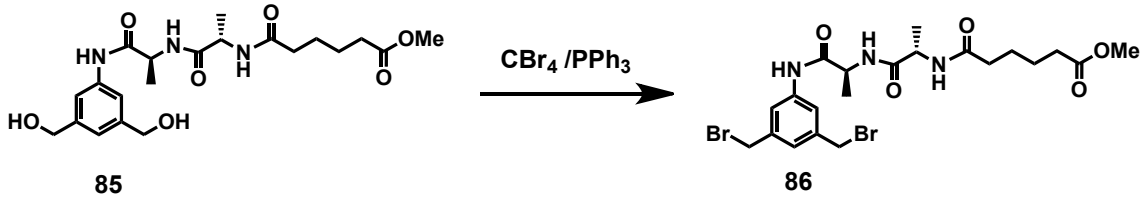
acetonitrilo (5x), luego se bombeó en el vacío alto a 35 °C para proporcionar el compuesto **83** (6,66 g, el 100 % de rendimiento). El material bruto se tomó para la etapa siguiente sin purificación. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6,75 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 6,44 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 4,52-4,44 (m, 1H), 4,43-4,36 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,35-2,29 (m, 2H), 2,25-2,18 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,36 (t, 6H, *J* = 6,0 Hz).



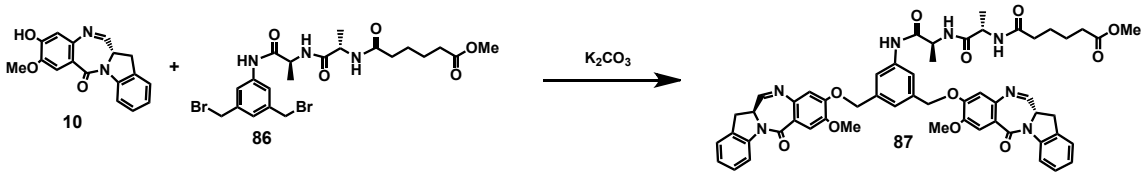
Etapa 4: El compuesto **83** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA (28,6 mL, 372 mmol) y agua desionizada (1,5 mL) a temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó en vacío alto para proporcionar el compuesto bruto **84** como un sólido pegajoso (5,88 g, el 100 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,21 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 6,81 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,40-2,33 (m, 2H), 2,31-2,24 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 4H), 1,51-1,45 (m, 3H), 1,42-1,37 (m, 3H).



Etapa 5: El compuesto **84** (5,6 g, 18,52 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (118 mL) y metanol anhidro (58,8 mL). Se agregaron (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (2,70 g, 17,64 mmol) y EEDQ (8,72 g, 35,3 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, durante la noche. El disolvente se limpió y se agregó acetato de etilo. La suspensión resultante se filtró, se lavó con acetato de etilo y se secó al vacío/N_2 para proporcionar el compuesto **85** (2,79 g, el 36 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 9,82 (s, 1H), 8,05, (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 8,01 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 7,46 (s, 2H), 6,95 (3, 1H), 5,21-5,12 (m, 2H), 4,47-4,42 (m, 4H), 4,40-4,33 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,33-2,26 (m, 2H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,54-1,46 (m, 4H), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,22 (d, 3H, *J* = 4,4 Hz).

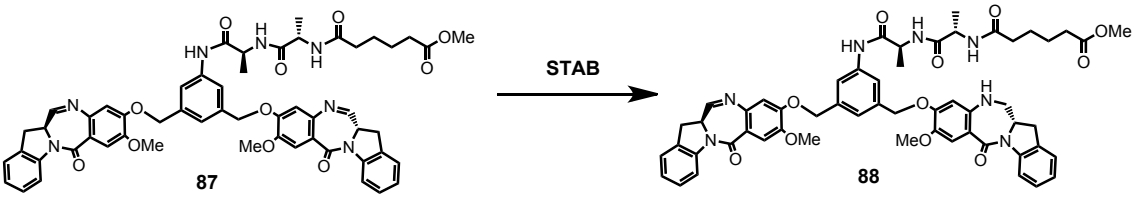


Etapa 6: El Compuesto 85 (0,52 g, 1,189 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,183 g, 3,57 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (11,89 mL). Se agregó trifenilfosfina (0,935 g, 3,57 mmol) y la reacción se agitó en argón durante cuatro horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **86** (262 mg, el 39% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 10,01 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,67 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,70-4,64 (m, 4H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,31-4,23 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,34-2,26 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).

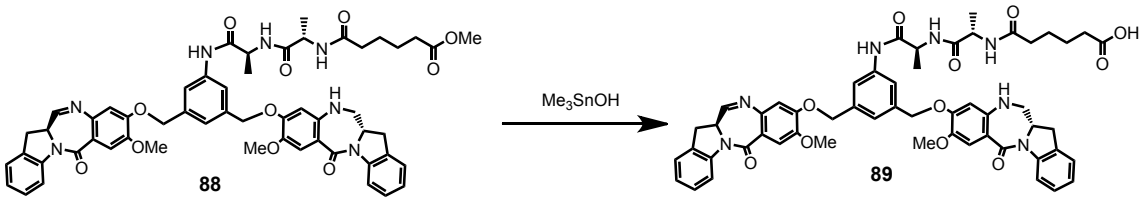


Etapa 7: Se preparó el compuesto **87** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó

mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **87** (336 mg, el 74% de rendimiento). LCMS = 5,91 min (método de 15 min). MS (m/z): 990,6 $(M + 1)^+$.

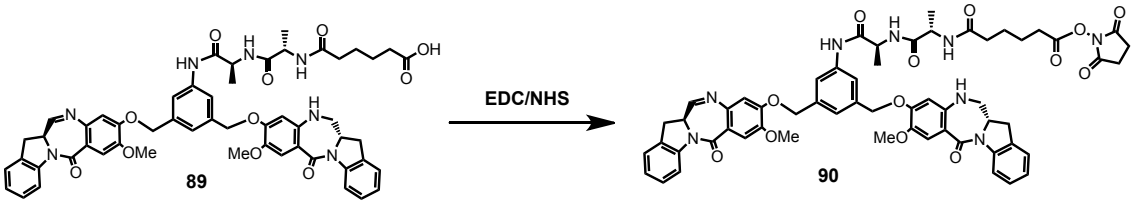


Etapa 8: Se preparó el compuesto **88** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **88** (85,5 mg, el 25% de rendimiento). LCMS =6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 992,6 $(M + 1)^+$.



Etapa 9: Se preparó el compuesto **88** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. El material bruto se pasó a través de un tapón de sílice para proporcionar el compuesto **89** (48,8 mg, el 80% de rendimiento). LCMS = 5,89 min (método de 15 min). MS (m/z):

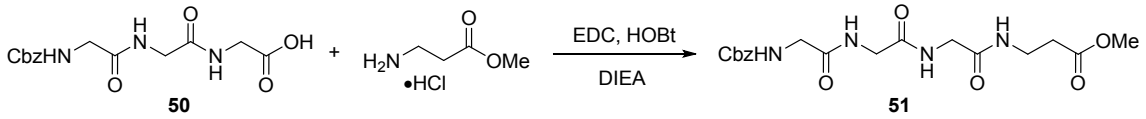
978,6 (M + 1)$^{+}$.



Etapa 10: Se preparó el compuesto **90** de forma similar a **14** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **90** (8,2 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 1075,4 (M + 1)$^{+}$.

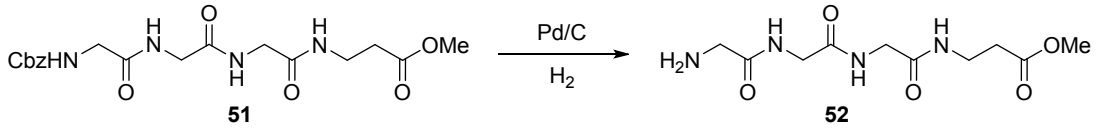
Ejemplo 7. Síntesis de 1-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-

il)oxi)metil)fenil)-1,4,7,10-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazatetradecan-14-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **63**)



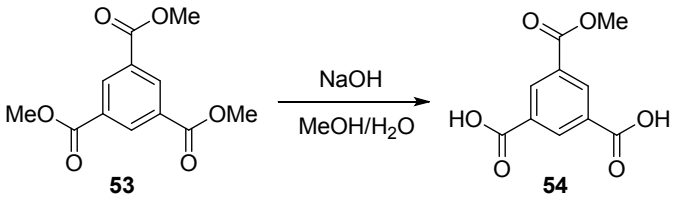
Etapa 1: Se disolvieron Z-Gly-Gly-GlyOH compuesto **50** (1,0 g, 3,09 mmol) y β-alanina·metiléster HCl (453 mg, 3,25 mmol) en DMF (12,37 mL). Se agregaron EDC·HCl (623 mg, 3,25 mmol) y HOBt (497 mg, 3,25 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (1,08 mL, 6,19 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se formó un lote de precipitado blanco. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2/MeOH (5:1, 30 mL) y se lavó con $NaHCO_3$ sat., NH_4Cl sat. y salmuera. La capa orgánica se puso turbia. Se agregó EtOAc (15 mL) a la capa orgánica para precipitar el producto. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con agua (10 mL) y CH_3CN (2 x 15 mL) para obtener el compuesto puro **51** como un polvo blanco (880 mg, el 70 % de rendimiento) sin purificación. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,16 (bt, 1H, *J* = 5,4 Hz), 8,11 (bt,

1H, *J* = 5,6 Hz), 7,88-7,85 (m, 1H), 7,49 (bt, 1H, *J* = 5,5 Hz), 7,40-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 3,74 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz), 3,67 (t, 4H, *J* = 6,2 Hz), 3,60 (s, 3H), 3,29 (q, 1H, *J* = 6,4 Hz), 2,47 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz).



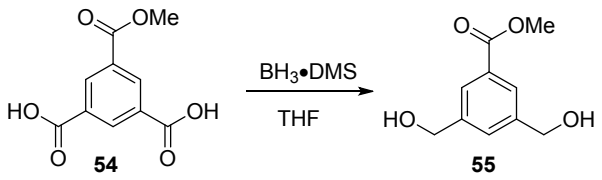
Etapa 2: Se disolvió el compuesto **51** (876 mg, 2,145 mmol) en MeOH (20,4 mL) y agua (1,02 mL) y se purgó con Ar. La solución se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo con el 50 % de agua, 228 mg). Se burbujeó H_2 a través de un balón durante un minuto. La reacción se agitó en un balón de H_2 durante la noche. Se agregó H_2O (~ 3 mL) a la mezcla de reacción para disolver todos los sólidos blancos formados. La solución luego se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. El residuo se disolvió en CH_3CN (20 mL) y se concentró. Esto se repitió 2 veces más. El sólido gomoso resultante se precipitó con la adición de CH_3CN (~ 15 mL). La suspensión blanca espesa se agitó durante 10 min, se filtró y se lavó con CH_3CN. El sólido

se secó al vacío/N_2 durante 1,5 h para obtener el compuesto **52** como un sólido blanco (450 mg, 76% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,18-8,12 (m, 2H), 7,88 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz), 3,75 (s, 2H), 3,65 (d, 2H, *J* = 5,9 Hz), 3,6 (s, 3H), 3,33-3,27 (m, 4H), 2,47 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz), 1,94 (bs, 1H).



Etapa 3: Se agregó NaOH (1,665 g, 41,6 mmol) a una solución agitada de benceno-1,3,5-tricarboxilato de trimetilo compuesto **53** (5 g, 19,82 mmol) en MeOH (66,1 mL) y agua (13,22 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo en Ar durante 3 h. Se formaron lotes de precipitado blanco. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con H_2O hasta que se disolvieron todos los sólidos. La mezcla se acidificó a pH ~ 2-3 con 5 N de HCl acuoso, se extrajo con EtOAc (3x), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se disolvió en EtOAc caliente (50 mL) y se enfrió a temperatura ambiente lentamente. El precipitado se filtró (el precipitado

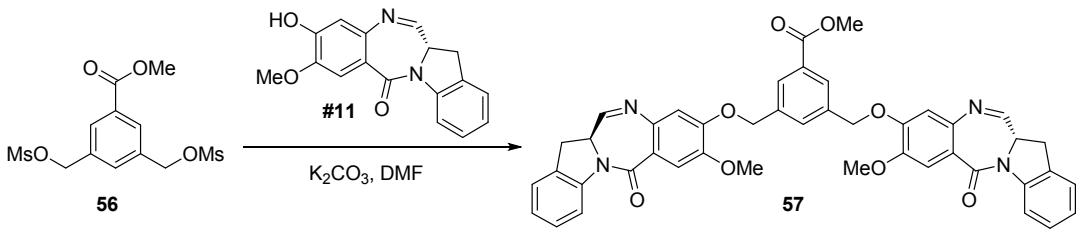
era subproducto y *no* producto). El licor madre se concentró para obtener el compuesto **54** como un sólido blanco (3,45 g, el 78 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 13,62 (bs, 2H), 8,65 (s, 3H), 3,93 (s, 3H). LCMS = 3,209 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^{+}): 244,90 (M+H).



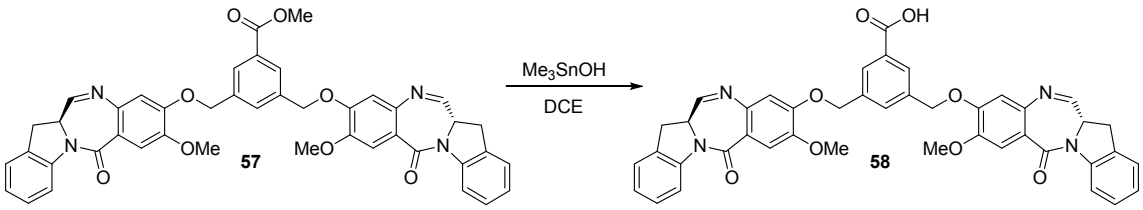
Etapa 4: Se disolvió diácido compuesto **54** (1,0 g, 4,46 mmol) en THF (17,84 mL). La solución se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente BH_3·DMS (2 M en THF) (8,92 mL, 17,84 mmol) en Ar. La mezcla se agitó a 0 °C durante 5 min, luego se entibió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se expuso al aire y se inactivó lentamente con MeOH, seguido de adición lenta de H_2O hasta que no se observó ninguna evolución del gas. La mezcla se extrajo con EtOAc (2x) y las capas se separaron. Las capas orgánicas se lavaron con ~ 3 % H_2O_2 acuoso, solución de ácido cítrico ac. y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4, se filtraron y se concentraron. El residuo

bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 20% y el 100%) para obtener diol compuesto **55** como un sólido blanco (385 mg, el 44% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 7,81 (s, 2H), 7,52 (s, 1H), 5,33 (bs, 2H), 4,56 (s, 4H), 3,86 (s, 3H).

Etapa 5: Se disolvió diol compuesto **55** (320 mg, 1,631 mmol) en DCM (10,9 mL) en Ar. La solución se enfrió a -5 °C y se agregó TEA (0,568 mL, 4,08 mmol), seguido de una adición lenta de MsCl (0,292 mL, 3,75 mmol), momento en el que el color se volvió inmediatamente amarillo tras la adición, luego rojo oscuro/marrón. La mezcla de reacción se agitó a -5 °C en Ar durante 1,5 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua helada y se extrajo con EtOAc (2x). La capa orgánica se lavó con agua (2x), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró para obtener el dimesilato puro compuesto **56** (435 mg, el 76 % de rendimiento).

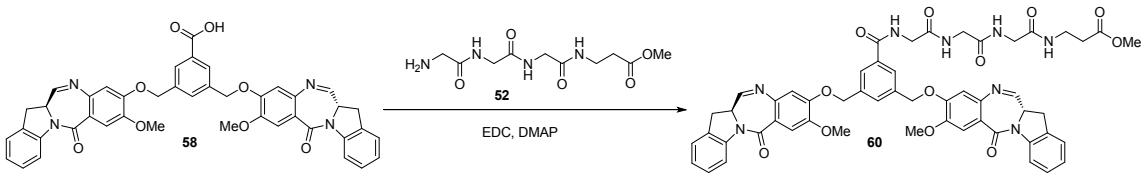


Etapa 6: Se disolvió dimesilato compuesto **56** (435 mg, 1,11 mmol) en DMF (5,55 mL). Se agregó monómero IGN compuesto **10** (719 mg, 2,444 mmol), seguido de y K_2CO_3 (384 mg, 2,78 mmol) y se agitó a temperatura ambiente en Ar durante la noche. Se agregó agua (20 mL) para precipitar el producto. La suspensión se agitó durante 5 min, se filtró y se secó al vacío/N_2 durante 1,5 h. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 50% y el 100%; luego el 5 % de MeOH/DCM) para obtener el compuesto **57** como un sólido amarillo (535 mg, el 64% de rendimiento, 2 etapas). LCMS = 6,973 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 749,4 (M+H).



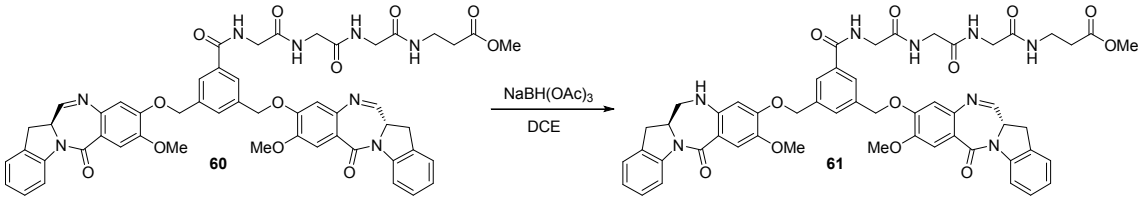
Etapa 7: Se disolvió el compuesto **57** (100 mg, 0,134 mmol) en

DCE (1,34 mL). Se agregó trimetilestananol (362 mg, 2,003 mmol) y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La capa acuosa se acidificó a pH ~4 con 1 M HCl y se extrajo con DCM (3x), se secó sobre Na_2SO_4, se filtró y se concentró. El producto bruto se tapó a través de un tapón de sílice corto, se enjuagó con DCM/MeOH (10:1, 50 mL) y se concentró para obtener el compuesto **58** como un sólido amarillo pálido (100 mg, el 100 % de rendimiento). LCMS = 5,872 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 735,3 (M+H).

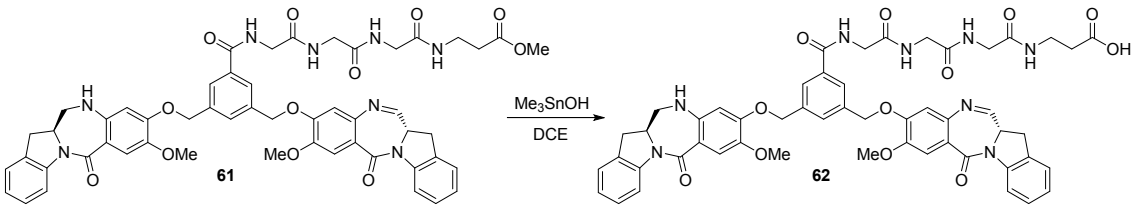


Etapa 8: Se disolvieron ácido compuesto **58** (80 mg, 0,087 mmol) y amina compuesto **52** (36 mg, 0,131 mmol) en DMF (871 µL). Se agregaron EDC·HCl (25 mg, 0,131 mmol) y DMAP (10,6 mg, 0,087 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se agregó agua (4 mL) para precipitar el producto. La suspensión se agitó durante 5 min, se filtró y se secó al vacío/N_2. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida

en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 20%) para obtener el compuesto **60** como un sólido amarillo (37 mg, el 43% de rendimiento). LCMS = 4,605 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 991,35 (M+H).

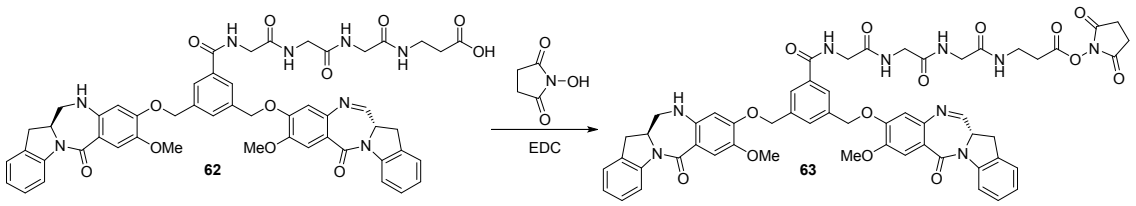


Etapa 9: Se preparó el compuesto **61** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **61** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 25% de rendimiento). LCMS = 5,421 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 993,7 (M+H).



Etapa 10: Se preparó el compuesto **62** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto bruto **62** como un sólido amarillo después del taponamiento a través de

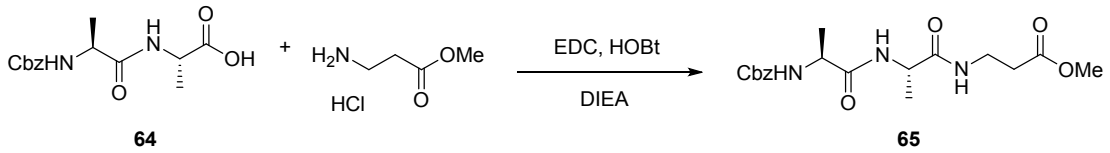
un tapón de sílice corto (13 mg, el 90 % de rendimiento). LCMS = 4,693 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 979,35 (M+H).



Etapa 11: Se preparó el compuesto **63** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 1-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo [5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-1,4,7,10-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazatetradecan-14-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **63** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (4 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,495 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1076,7 (M+H).

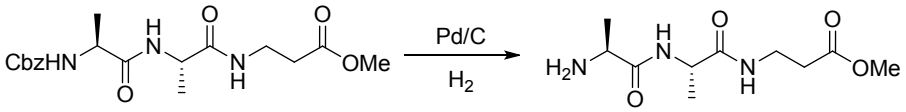
Ejemplo 8. Síntesis de 3-((S)-2-((S)-2-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-

benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)benzamido) propanamido)propanamido)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **70**)



Etapa 1: Se disolvieron Z-L-Ala-L-Ala-OH compuesto **64** (3,0 g, 10,19 mmol) y β-alanina·metiléster HCl (1,565 g, 11,21 mmol) en DMF (20,39 mL). Se agregaron EDC·HCl (2,150 g, 11,21 mmol) y HOBt (1,561 g, 10,19 mmol) seguido de DIPEA (4,44 mL, 25,5 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente en Ar durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH_4Cl sat., $NaHCO_3$ sat. y salmuera. Se agregaron hexanos a la capa orgánica, momento en el que la solución se volvió turbia con precipitado. La suspensión se agitó durante unos minutos, se filtró y se lavó con EtOAc/hexanos (3:1). El sólido se secó al vacío/N_2 para obtener el compuesto **65** como un sólido blanco (3,11 g, 80% de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz,

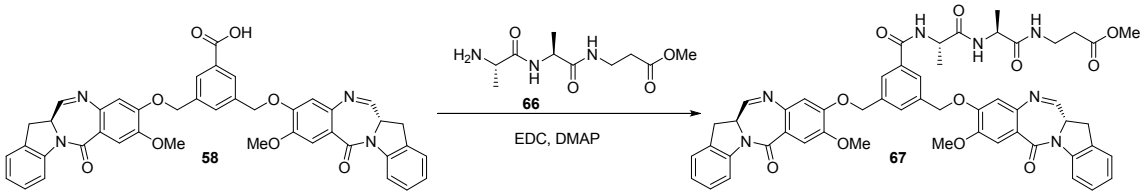
DMSO-*d6*): δ 7,91 (d, 2H, *J* = 7,0 Hz), 7,46 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz), 6,39-7,30 (m, 5H), 5,02 (d, 2H, *J* = 2,3 Hz), 4,20 (p, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,04 (p, 1H, *J* = 7,3 Hz), 3,59 (s, 3H), 3,30-3,22 (m, 1H), 2,45 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz), 1,18 (t evidente, 6H, *J* = 7,2 Hz). LCMS = 3,942 min (método de 8 min). Masa observada (ESI^+): 380,10 (M+H).



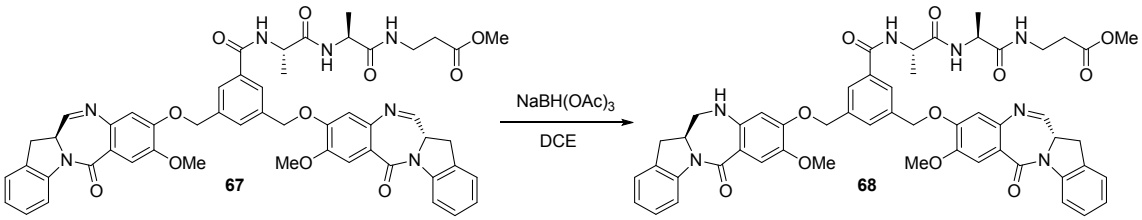
65 **66**

Etapa 2: Se disolvió el compuesto **65** (1,0 g, 2,64 mmol) en metanol (12,55 mL), agua (0,628 mL) y THF (2 mL). La solución se purgó con Ar y luego se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo con el 50 % de agua, 0,140 g). Se burbujeó H_2 en la solución durante un minuto y la reacción se agitó adicionalmente en un balón de H_2 (1 atm) durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. Se agregó CH_3CN (15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **66** como un sólido blanquecino (650 mg, el

100 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,03-7,99 (m, 2H), 4,24-4,18 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,31-3,22 (m, 5H), 2,46 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz), 1,17 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 1,12 (d, 3H, *J* = 6,9 Hz).

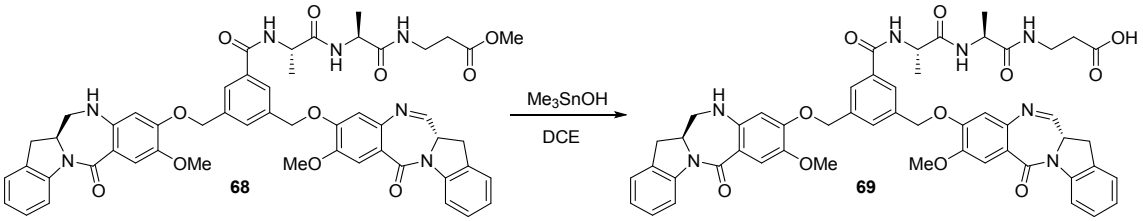


Etapa 3: Se preparó el compuesto **67** de forma similar a **60** en el ejemplo 7. Se obtuvo el compuesto **67** como un sólido amarillo después de cromatografía en gel de sílice (69 mg, el 53 % de rendimiento). LCMS = 4,843 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 962,25 (M+H).

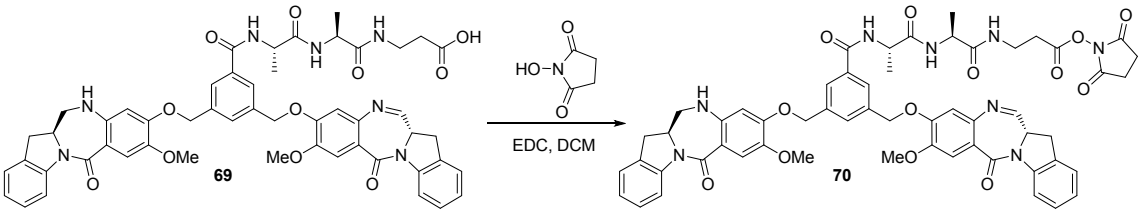


Etapa 4: Se preparó el compuesto **68** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **68** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (11,5 mg,

el 19% de rendimiento). LCMS = 5,136 min (método de 8 min). Masa observada (ESI$^+$): 964,35 (M+H).



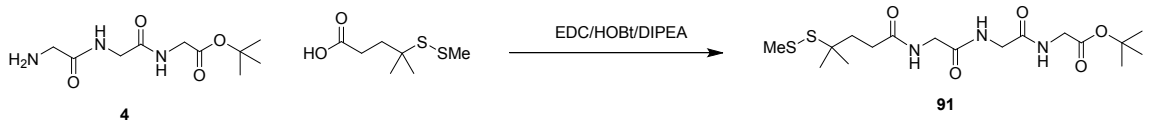
Etapa 5: Se preparó el compuesto **69** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto bruto **69** como un sólido amarillo después del taponamiento a través de un tapón de sílice corto (13 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 5,640 min (método de 15 min). Masa observada (ESI$^+$): 950,4 (M+H).



Etapa 6: Se preparó el compuesto **70** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 2,5-dioxopirrolidin-1-il-3-((S)-2-((S)-2-(3-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-

((((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)benzamido) propanamido)propanamido) propanoato, se obtuvo el compuesto **70** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (5 mg, el 35 % de rendimiento). LCMS = 6,138 min (método de 15 min). Masa observada (ESI^+): 1047,4 (M+H).

Ejemplo 9. Síntesis de ácido (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-mercapto-4-metilpentanamido)acetamido) acetamido)acetamido)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (compuesto **98**)



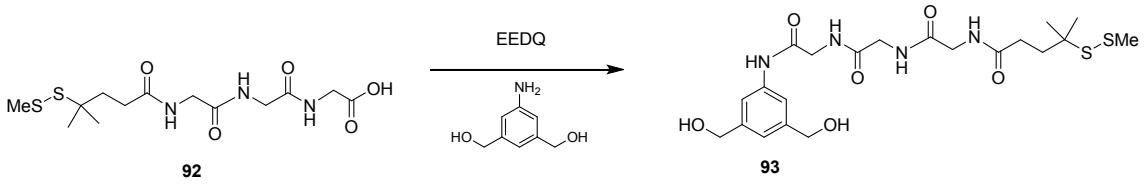
Etapa 1: se disolvieron el compuesto **4** (2,0 g, 8,15 mmol) y ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (1,743 g, 8,97 mmol) en DMF anhidro (27,2 mL). Se agregaron EDC·HCl

(1,719 g, 8,97 mmol) y HOBt (1,249 g, 8,15 mmol) seguido de DIPEA (2,85 mL, 16,31 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El aceite bruto se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo (3x), luego se bombeó en vacío alto a 35 °C durante aproximadamente 1,5 horas para proporcionar el compuesto **91**, el cual se tomó sin purificación adicional (3,44 g, el 100 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ 8,18-8,09 (m, 3H), 3,76-3,68 (m, 6H), 2,41 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,84-1,77 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,25 (s, 6H).

91 **92**

Etapa 2: El compuesto **91** (3,44 g, 8,15 mmol) se agitó en TFA (12,56 mL, 163 mmol) y agua desionizada (0,65 mL) a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La reacción se diluyó con acetonitrilo y se evaporó hasta que se secó. El sólido bruto

se suspendió con acetato de etilo, se filtró y se enjuagó con acetato de etilo y luego diclorometano/metanol (1:1) para



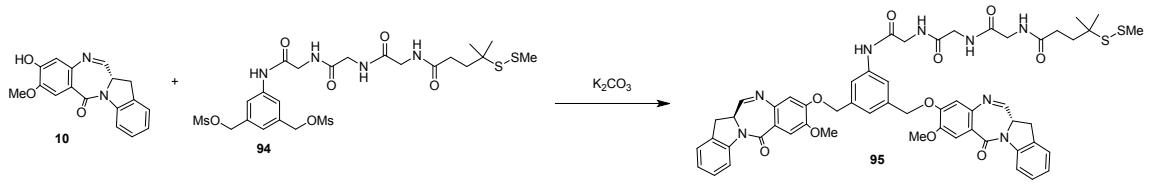
(s, 6H).

Etapa 3: El compuesto **92** (1,74 g, 4,76 mmol) se disolvió en diclorometano (30,2 mL) y metanol (15,11 mL). Se agregaron N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (2,243 g, 9,07 mmol) y (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (0,695 g, 4,53 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó y se agregó acetato de etilo. El sólido se filtró a través de Celite y se lavó con acetato de etilo y luego metanol. El filtrado se evaporó y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **93** (569 mg, el 25 % de rendimiento). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ

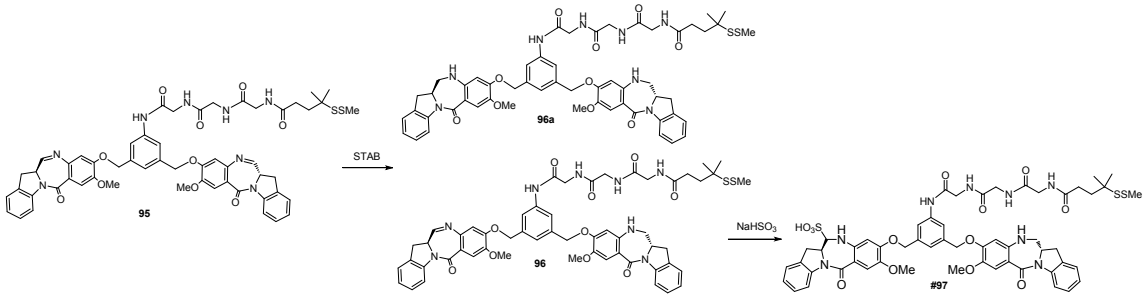
9,74 (s, 1H), 8,24-8,15 (m, 3H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, *J* = 5,6 Hz), 4,45 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz,), 3,87 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz,), 3,77 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz,), 3,73 (d, 2H, *J* = 5,6 Hz,), 2,40 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,83 -1,76 (m, 2H), 1,24 (s, 6H).

Etapa 4: El Compuesto 93 (305 mg, 0,609 mmol) se suspendió en DCM anhidro (5,992 mL). Se agregó DMF anhidro hasta que la solución se volvió homogénea (~2,5 mL). La solución se enfrió a –10 °C en un baño de acetona/hielo seco. Se agregaron trietilamina (0,425 mL, 3,05 mmol), seguido de anhídrido metanosulfónico (274 mg, 1,523 mmol). La mezcla se agitó a –10 °C durante 1 hora. La reacción se inactivó con agua helada y se extrajo con acetato de etilo/metanol helado (20:1). La capa orgánica se lavó con agua helada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró. El material bruto se secó en vacío alto para proporcionar el compuesto **94** (380 mg, el 95 % de rendimiento). LCMS = 4,2 min (método de 15 min). MS

(m/z): 655,0 $(M-1)^-$.

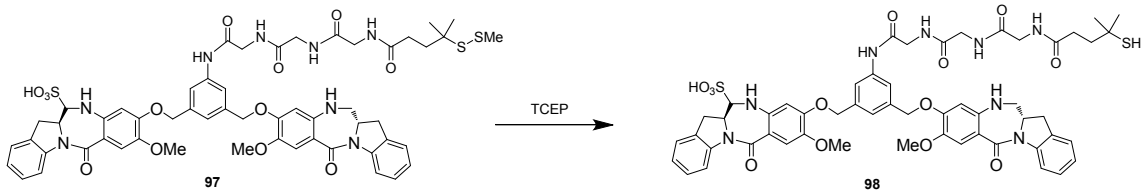


Etapa 5: Se preparó el compuesto **95** de forma similar al compuesto **57** en el ejemplo 7. El sólido bruto se disolvió en diclorometano/metanol (10:1), se lavó con agua y la orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se extrajo *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **95** (445 mg, el 42% de rendimiento, el 54% de pureza). LCMS = 6,64 min (método de 15 min). MS (m/z): 1053,4 $(M + 1)^+$ y 1051,3 $(M -1)^-$.



Etapa 6: Se disolvió el compuesto **95** (445 mg, 0,423 mmol) en 1,2-dicloroetano (2,82 mL). Se agitó triacitoxiborohidruro de

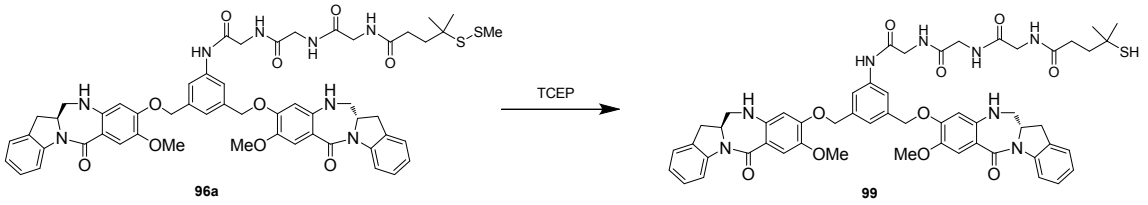
sodio (80 mg, 0,359 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con cloruro de amonio saturado. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó para proporcionar una mezcla de los compuestos **95**, **96** y **96a** (496 mg). La mezcla bruta se disolvió en 2-propanol (39,17 mL) y agua (19,59 mL). Se agregó bisulfito de sodio (245 mg, 2,35 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La mezcla se congeló y liofilizó para proporcionar un sólido blanco esponjoso que se purificó mediante RPHPLC (C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **97** (54 mg, el 10 % de rendimiento) y el compuesto **96a** (24 mg, el 5 % de rendimiento). LCMS (compuesto **97**) = 4,83 min (método de 15 min) y LCMS (compuesto **96a**) = 8,05 min (método de 15 min).



Etapa 7: a una solución agitada del compuesto **97** (54 mg, 0,047 mmol) en CH_3CN (3,85 mL) se agregó solución amortiguadora de TCEP/pH 6,5 reacción preparada (TCEP·HCl (46,7 mg), se disolvió en unas gota de agua desionizada, seguido de goteo de bicarbonato de sodio saturado hasta pH ~ 6,5. La solución se diluyó con 0,55 mL de pH=6,5, 1 M de amortiguador de fosfato de sodio y metanol (2.75 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego se congeló y se liofilizó. El sólido se purificó mediante RPHPLC (C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar ácido (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-mercapto-4-metilpentanamido)acetamido) acetamido)acetamido)-5-((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)bencil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indole-12-sulfónico, compuesto **98** (2 mg, el 4 % de rendimiento). LCMS = 4,32 min (método de 15 min). MS (m/z):

1089,3 (M -1)$^-$.

Ejemplo 10. Síntesis de N-(2-((2-((2-((3,5-bis((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-4-mercapto-4-metilpentanamida (compuesto **99**)



Se preparó el compuesto **99** de forma similar al compuesto **98** en el ejemplo 9. N-(2-((2-((2-((3,5-bis((((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-4-mercapto-4-metilpentanamida, se obtuvo el compuesto **99** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (6,3 mg, el 27 % de rendimiento). LCMS = 7,26 min (método de 15 min). MS (m/z): 1033,5 (M +Na)$^+$.

Ejemplo 11. Preparación de **huMOV19-14**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 8

equivalentes molares compuesto **14** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,0 de moléculas de IGN91 unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **14**, y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 90 % de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1 % del

compuesto no conjugado **14** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 0,78 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >87 % intacto mediante análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 12. Preparación de **huMOV19-sulfo-SPDB-98**

Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 3,9 mM del compuesto **98** y 3 mM de enlazador sulfo-SPDB en un DMA que contenía 10 mM de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se incubó durante 60 min antes de agregar un exceso de 20 veces del compuesto resultante **98**-sulfo-SPDB-NHS a una reacción que contenía 4 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM de HEPES pH 8,5 (90:10 agua: DMA). La solución se dejó conjugar durante la noche a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 100 mM de glicina, 20 mM de arginina, 2% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo

amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,7 de moléculas del compuesto **98** unidas por anticuerpo (mediante SEC utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **98**, y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 0,18 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 13. Preparación de **huMOV19-35**

Una reacción que contenía 2,5 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **35**, (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N*,*N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de

histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 8 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,9 de moléculas del compuesto **35** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para IGN128 y ε_{280} = 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 97% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <1% del compuesto no conjugado 35 (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,4 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 14. Preparación de **huMOV19-63**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 7 equivalentes molares del compuesto **63** (pretratados con un

exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **63** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para IGN131 y ε_{280} = 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **63** (mediante precipitación de acetona,

análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,6 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >90% intacto mediante análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7B.

Ejemplo 15. Preparación de **huMOV19-80**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 7 equivalentes molares del compuesto **80** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,5 de moléculas del compuesto **80** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **80** y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **80** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 2,4 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >90% intacto mediante análisis de chip de gel.

Ejemplo 16. Preparación de **huMOV19-90**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 3,9 equivalentes molares del compuesto **90** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 95:5 DMA:50 mM de succinato pH 5,5 durante 4 horas a 25 °C) en 15 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N*,*N*-dimetilacetamida) se incubó durante 4 horas a 25 °C. Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 10 mM de succinato, 50 mM de

cloruro de sodio, 8,5% p/v de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 30.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía una concentración de proteína final de 1,8 mg/ml y un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **90** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para IGN152 y ε_{280} = 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 98,3% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño); y <1,1% del compuesto no conjugado **90** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa). Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7B.

Ejemplo 17. Preparación de **huMOV19-49**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **49** (pretratados con un

exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 4 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,8 de moléculas del compuesto **49** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **49** y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 94% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño),

<0,1% del compuesto no conjugado **49** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,5 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >95% intacto mediante análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7C.

Ejemplo 18. Preparación de **huMOV19-sulfo-SPDB-99**

Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 1,95 mM del compuesto **99** y 1,5 mM de enlazador sulfo-SPDB en DMA que contenía 10 mM de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se incubó durante 20 min antes de la formación de casquetes con 4 mM de ácido maleimidopropiónico MPA. Un exceso de 6 veces del **99**-sulfo-SPDB-NHS resultante se agregó a una reacción que contenía 2,5 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM de HEPES pH 8,5 (82:18 agua: DMA). La solución se dejó conjugar durante la noche a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 20 mM de histidina, 50 mM de cloruro de sodio, 8,5% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25

DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 1,6 de moléculas del compuesto **99** unidas por anticuerpo (mediante UV/Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **99**, y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 0,59 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7C.

Ejemplo 19. Preparación de **huMOV19-70**

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **70** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente DMA (*N*,*N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 4 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el

amortiguador se intercambió en 20 mM de histidina, 100 mM de arginina, 2% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Después de la purificación, se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 18 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,0 de moléculas del compuesto **70** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30.115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **70** y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 94% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **70** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,3 mg/ml.

Ejemplo 20. Preparación de **huMOV19-23**

Una reacción que contenía 2,5 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 4 equivalentes molares del compuesto **23** (pretratados con un

exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 8 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,8 de moléculas del compuesto **23** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **23** y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 98% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <3%

del compuesto no conjugado **23** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,3 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7D.

Ejemplo 21. Ensayo de citometría de flujo para la afinidad de unión de los conjugados **huMOV19-14, huMOV19-90 y huMOV19-107**

Se diluyeron 100 µl/pocillo del conjugado **huMOV19-14, huMOV19-90** o **huMOV19-107** o el anticuerpo huMOV19 en amortiguador FACS (1 % de BSA, 1x PBS) en una placa de 96 pocillos (Falcon, fondo redondo) en una concentración inicial de 3x 10^{-8} M por duplicado y se diluyeron en serie 3 veces en amortiguador FACS a 4 °C. Se cultivaron células T47D (tumor de mama humano) en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies), 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) y 0,2 IU de insulina bovina/ml (Sigma), se lavaron una vez en PBS y se retiraron con versene (Life Technogies). Se resuspendieron las células T47D en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la versene y se contabilizaron en un contador Coulter. Se lavaron las células dos veces en amortiguador FACS frío, se centrifugaron entre

los lavados a 1200 rpm durante 5 min. Se añadieron 100 µl/ml de $2x10^4$ células/pocillo a los pocillos que contenían el conjugado, anticuerpo o amortiguador FACS solo y se incubaron a 4 °C durante 2 h. Después de la incubación, se centrifugaron las células como antes y se lavaron una vez en 200 µl/pocillo de amortiguador FACS frío. Se tiñeron las células con 200 µl/pocillo de anticuerpo secundario Anti-Humano-IgG-Fcγ de cabra conjugado con FITC (los controles incluidos fueron células sin teñir y células teñidas solo con el anticuerpo secundario) durante 40 min a 4 °C, se centrifugaron y se lavaron una vez en 200 µl/pocillo de PBS-D frío. Se fijaron las células en 200 µl/pocillo de 1 % de formaldehído/PBS-D y se almacenaron a 4 °C. Después del almacenamiento, se detectó la tinción de la superficie celular del conjugado o el anticuerpo utilizando citometría de flujo en un FACS Calibur (BD Biosciences). Se graficaron las medias geométricas contra la concentración logarítmica del conjugado o el anticuerpo utilizando GraphPad Prism y se calculó el EC_{50} a través de un análisis de regresión logística de 4 parámetros no lineal.

El ensayo de unión se repitió para el conjugado huMOV19-90 y

los datos se muestran en la figura 15B.

Tal como se muestra en la figura 1, la figura 15A, la figura 15B y la figura 20, los conjugados se unen de forma similar a la superficie de células T47D que expresan el antígeno diana que el anticuerpo no conjugado en citometría de flujo, demostrando así que la unión no se ve afectada por el proceso de conjugación.

Ejemplo 22. Ensayo de citotoxicidad para el conjugado huMOV19-14

Se diluyeron 100 µl/pocillo de conjugado **huMOV19-14** en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Corning, fondo plano) en concentraciones iniciales de $3,5x10^{-9}$M a $3,5\ x10^{-8}$ M por triplicado y se diluyeron en serie 3 veces en el medio anterior a temperatura ambiente. Se lavaron células KB (tumor epitelial bucal), cultivadas en EMEM (ATCC) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) una vez en PBS y se retiraron con 0,05 % de tripsina-EDTA (Life

Technologies). Se resuspendieron las células KB en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la tripsina y se contabilizaron en un contador Coulter. Se añadieron 100 µl/ml de $1x10^3$ células/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y se incubaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 5 días con y sin 1 µM de anticuerpo anti-FOLR1 de bloqueo (huMOV19). El volumen total es de 200 µl/pocillo. Después de la incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 20 µl/pocillo de WST-8 (Dojindo) y se dejaron crecer durante 2 h. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450 y 620 nm. Se restaron las absorbancias a 620 nm de las absorbancias a 450 nm. Se restó adicionalmente el fondo en los pocillos que contenían medio solo de las absorbancias corregidas y la fracción superviviente (SF) de células sin tratar se calculó en Excel. Se creó una gráfica XY de concentración de ADC (M) en función de SF utilizando Graph Pad Prism.

Tal como se muestra en la figura 2, el conjugado es altamente potente contra las células KB con un IC_{50} de $4x10^{-12}$ M. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado reduce

significativamente el efecto citotóxico, lo que demuestra especificidad de antígeno.

Ejemplo 23. Ensayo de citotoxicidad no específica para los conjugados **huMOV19-14** y **huMOV19-90**

Se diluyeron 100 µl/pocillo de **huMOV19-14** o **huMOV19-90** en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies), 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) y βME (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Falcon, fondo redondo) en concentraciones entre 1 e-10 M y 4 e-10 M por sextuplicado. Ambas células 300.19 (ratón) con expresión de FOLR1(FR1#14) recombinante o sin vector de expresión (parental) se contaron en un contador Coulter. Se añadieron 50 µl/ml de 1000 células FR1#14/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo, se añadieron 50 µl/ml de 2000 células parentales/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y ambas FR1#14 y las células parentales se añadieron juntas a pocillos que contenían el conjugado o medio solo. Se incubaron todas las placas en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 4 días. El volumen total fue de 150 µl/pocillo. Después de la

incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 75 µl/pocillo de Cell Titer Glo (Promega) y se dejaron crecer durante 45 min. Se leyó la luminiscencia en un luminómetro y se sustrajo el fondo en los pocillos que contenían medio solo de todos los valores. Se graficó una gráfica de barras del promedio de cada tratamiento de células utilizando Graph Pad Prism.

Tal como se muestra en la figura 3, el conjugado **huMOV19-14** presenta efecto citotóxico testigo débil en las células negativas al antígeno vecinas.

Tal como se muestra en la figura 13, el conjugado **huMov19-90** presenta actividad de destrucción no específica fuerte.

Ejemplo 24. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* para el conjugados **huMy9-6-14**

Se agregaron diluciones de conjugados a pocillos de placas de 96 pocillos que contenían entre 2 x 10^3 y 1 x 10^4 células por pocillo en medio de crecimiento adecuado. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los compuestos de prueba, así como pocillos que contenían el medio solo. Las placas se incubaron

de cuatro a seis días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía el 6 % de CO_2. Luego se agregó reactivo WST-8, 10 % v/v, (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD), a los pocillos y las placas se incubaron a 37 °C de 2 a 6 h. Luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/650 nm y se sustrajo la absorbancia en 650 nm (dispersión de luz no específica por células). Se calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas).

Tal como se muestra en la figura 3, el conjugado es altamente potente contra diversas células cancerosas positivas del antígeno; mientras las células L-540 negativos del antígeno permanecen cuando se exponen al mismo conjugado.

Ejemplo 25. Ensayo de citotoxicidad no específica para el conjugados **huMy9-6-14**

SE realizaron pruebas preliminares para determinar la concentración de **huMy9-6-14** que no era citotóxica para las

células RADA-1 negativas del antígeno, pero destruyó todas las células KARA positivas del antígeno. Se colocaron en placas RADA-1 (500 células por pocillo) y KARA (500, 1000, 2000, 4000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se prepararon diluciones de **huMy9-6-14** en el medio de cultivo celular (medio RPMI1640 complementado con el 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 50 mg/L de gentamicina) y se agregaron a las células. Se incubaron las placas durante 4 días a 37 °C y se determinó la viabilidad de las células en cada pocillo utilizando reactivo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Para evaluar la potencia no específica de los conjugados, se mezclaron células RADA-1 y células KARA en diferentes proporciones (500 células RADA-1 más ninguna célula KARA; 500 células RADA-1 más 500 células KARA; 500 células RADA-1 más 1000 células KARA; 500 células RADA-1 más 2000 células KARA; 500 células RADA-1 más 4000 células KARA) y se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Luego se agregaron 1,0e-9M o 5,0e-10M de **huMy9-6-14** - las concentraciones que no eran citotóxicas para las células RADA-1 pero que destruyeron todas las células KARA - a las mezclas

celulares. Se incubaron placas durante 4 días a 37 °C y se determinó la viabilidad de las células RADA-1 en cada pocillo utilizando reactivo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/650 nm y se sustrajo la absorbancia en 650 nm (dispersión de luz no específica por células).

Tal como se muestra en la figura 5, el conjugado presenta efecto de destrucción no específica en las células negativas del antígeno vecinas.

Ejemplo 26. Actividad antitumoral de huMOV19-80 y huMOV19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC en ratones SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 1 x 10^7 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 (día 7 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales

basándose en el volumen tumoral en 5 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón), **huMOV19-80** o **huMOV19-90** en 5 y 25 µg/kg basándose en concentración de **huMOV19-80** o **huMOV19-90** en el día 1 (día 8 después de la inoculación). huMOV19 es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente al receptor 1 de folato (FOLR1).

Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm^3 utilizando la fórmula V = longitud x ancho x altura x ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

T/C (%) = volumen tumoral medio de los tratados / volumen tumoral medio de control x 100.

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos

tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm^3. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm^3). De acuerdo con las normas NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C <10 % se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra en la figura 6, el conjugado **huMOV19-90** es altamente activo en la dosis de 5 y de 25 µg/kg; mientras que el conjugado **huMOV19-80** es altamente activo en la dosis de 25 µg/kg.

Ejemplo 27. Preparación de huML66-90

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huML66, un anticuerpo anti-EGFR (véase WO 2012/058592, incorporada a la presente mediante esta referencia en su totalidad) y 3,5 equivalentes molares del compuesto **90** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:50 mM de succinato pH 5,5 durante 4 horas a 25 °C) en 15 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente

DMA (N,N-dimetilacetamida) se incubó durante 4 horas a 25 °C. Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 20 mM de histidina, 50 mM de cloruro de sodio, 8,5% p/v de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 30.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía una concentración de proteína final de 0,9 mg/ml y un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **90** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molares $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.280 cm-1M-1 y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 cm-1M-1 para el compuesto **90**, y $\varepsilon_{280\ nm}$= 205.520 cm-1M-1 para el anticuerpo huML66); el 99,1 % de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño); y el <1 % de IGN149 no conjugado (análisis HPLC de fase inversa de columna doble). Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 8.

Ejemplo 28. Ensayos citotóxicos in vitro para el conjugado huML66-90

Se midió la capacidad del conjugado **huML66-90** de inhibir el crecimiento celular utilizando ensayos de citotoxicidad in vitro. Las células diana se colocaron en placas en 1-2.000 células por pocillo en 100 µL en medio RPMI completo (RPMI-1640, 10 % de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, el 1 % de penicilina-estreptomicina, todos reactivos de Invitrogen). Los anticuerpos se diluyeron en medio RPMI completo utilizando series de dilución de 3 veces y se agregaron 100 µL por pocillo. La concentración final típicamente osciló entre 3 x 10-8 M y 4,6 x 10-12 M. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO2 durante 5-6 días. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo WST-8 colorimétrico (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US). WST-8 se reduce por deshidrogenasas en las células vivas a un producto de formazán naranja que es soluble en medios de cultivo tisular. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Se agregó WST-8 a 10 % del volumen final y las placas

se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO2 durante un adicional de 2-4 horas. Las placas se analizaron mediante la medición de la absorbancia en 450 nm (A450) en un lector de placas multipocillos. Se sustrajo la absorbancia A450 de fondo de los pocillos con medio y WST-8 solo de todos los valores. Se calculó el porcentaje de viabilidad dividiendo el valor de cada muestra tratada por el valor promedio de pocillos con células no tratadas. Porcentaje de viabilidad = 100* (muestra tratada de A450 – A450 de fondo)/ (muestra no tratada A450 – A450 de fondo). El valor del porcentaje de viabilidad se graficó contra la concentración de anticuerpo en una gráfica semilogarítmica para cada tratamiento. Se generaron curvas con respuesta a la dosis mediante regresión no lineal y se calculó el valor de EC_{50} de cada curva utilizando GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA).

Actividad citotóxica in vitro

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* del conjugado **huML66-90** en presencia y ausencia de exceso de anticuerpo no conjugado y se comparó con la actividad de un conjugado **huIgG-90** no específico en células que expresaban EGFR y los resultados de un ensayo

de citotoxicidad típico se muestran en la figura 9. El conjugado **huML66-90** produjo la destrucción celular específica de células SCC-HN Detroit-562 con un valor de EC_{50} de 16 pM. La presencia de exceso de anticuerpo no conjugado redujo significativamente la actividad y produjo un valor de EC_{50} de aproximadamente 2 nM. De forma similar, el conjugado **huIgG-90** sin ningún anticuerpo de control huIgG que no es de unión produjo la destrucción celular con un valor de EC_{50} de aproximadamente 8 nM.

Del mismo modo, el conjugado **huML66-90** produjo una destrucción celular específica de las células NCI-H292 NSCLC con un valor de EC_{50} de 12 pM. La presencia de exceso de anticuerpo no conjugado redujo significativamente la actividad y produjo un valor de EC_{50} de aproximadamente 2 nM. De forma similar, el conjugado **huIgG-90** sin ningún anticuerpo de control huIgG que no es de unión produjo la destrucción celular con un valor de EC_{50} de aproximadamente 8 nM.

De forma similar, también se observó la destrucción celular específica de células NCI-H1703.

Tabla 1.

Conjugado	**EC_{50} de Detroit en pM**	**EC_{50} de NCI-H292 en pM**	**EC_{50} de NCI-H1703 en pM**
huML66-90	16	12	20
huML66-90 +bloque	2.350	1.570	2.140
huIgG-90 control	8.350	8.350	N/A

Ejemplo 29. Actividad citotóxica *in vitro* para huMOV19-90

Se diluyeron 100 µl/pocillo de conjugado **huMOV19-90** en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Corning, fondo plano) en concentraciones iniciales entre 3,5e-9 M y 3,5 e-8 M por triplicado y se diluyeron en serie 3 veces en el medio anterior a temperatura ambiente. Se lavaron células KB (tumor epitelial bucal), cultivadas en EMEM (ATCC) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies)

una vez en PBS y se retiraron con 0,05 % de tripsina-EDTA (Life Technologies). Otras células evaluadas fueron NCI-H2110 (NSCLC) y T47D (epiteliales de mama) cultivadas en RPMI-1640 (LifeTechnologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies). También se complementó el medio de T47D con 0,2 IU/ml de insulina bovina. Se resuspendieron todas las células en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la tripsina y se contabilizaron utilizando un hemacitómetro. Se añadieron 100 µl/ml de 1000 células KB/pocillo o 2000 células T47D y NCI-H2110/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y se incubaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 5 días con y sin 1 µM de anticuerpo anti-FOLR1 de bloqueo (huMOV19). El volumen total es de 200 µl/pocillo. La concentración inicial de cada conjugado en células KB fue de 3,5e-9 M y para células T47D y NCI-H2110, la concentración inicial de cada conjugado fue de 3,5e-8 M. Después de la incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 20 µl/pocillo de WST-8 (Dojindo) y se dejaron crecer durante 2 h. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a

450 y 620 nm. Se restaron las absorbancias a 620 nm de las absorbancias a 450 nm. Se restó adicionalmente el fondo en los pocillos que contenían medio solo de las absorbancias corregidas y la fracción superviviente (SF) de células sin tratar se calculó en Excel. Se creó una gráfica XY de concentración de ADC (M) en función de SF utilizando Graph Pad Prism.

Tal como se muestra en las figuras 10-12 y la tabla 2, el conjugado **huMOV19-90** es altamente potente contra las células KB, las células T47 D y las células NCI-H2110. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado reduce significativamente el efecto citotóxico, lo que demuestra especificidad de antígeno.

Tabla 2.

	KB		**NCI-H2110**		**T47D**	
	- Bloque	+Bloque	- Bloque	+Bloque	- Bloque	+Bloque
IC_{50}	4e-12 M	8e-10 M	2e-11 M	1e-8 M	3e-11 M	8e-9 M

En otro experimento, se midió la capacidad de los conjugados de inhibir el crecimiento celular utilizando un ensayo de citotoxicidad in vitro basado en WST-8. Se trataron células en placas de 96 pocillos (típicamente, $1x10^3$ por pocillo) con el conjugado en diversas concentraciones en un medios de cultivo celular adecuado con un volumen total de 0,2 ml. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los compuestos de prueba, y pocillos que contenían el medio solo. Las placas se incubaron de 4 a 6 días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía el 6 % de CO_2. Luego se agregó reactivo WST-8 (10 %, volumen/volumen; Dojindo Molecular Technologies), a los pocillos y las placas se incubaron a 37 °C de 2 a 6 horas dependiendo de la línea celular. Luego, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/620 nm y se sustrajo la absorbancia en 620 nm (dispersión de luz no específica por células). Los valores de OD_{450} resultantes se utilizaron para calcular fracciones supervivientes evidentes de las células utilizado GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA). Se

calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas). Se generaron curvas de respuesta a la dosis mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea con pendiente variable en Graph Pad Prism. Se generó IC_{50} (concentración inhibidora 50 %) a través del software.

Los conjugados eran activos contra las líneas celulares evaluadas Ishikawa (cáncer de endometrio), KB (cáncer de cuello uterino) y NCI-H2110 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) como se muestra en la figura 21 y la tabla 3. La actividad de destrucción de células era dependiente de FOLR1, debido a que un exceso de anticuerpo huMOV19 no modificado (1 µM) disminuyó considerablemente la potencia del conjugado (entre 20 y 200 veces).

Tabla 3

Línea celular	IC50, nM			
	huMOV19-90		huMOV19-107	
	Conjugado	Conjugado+anticuerpo no modificado	Conjugado	Conjugado+anticuerpo no modificado
Ishikawa	0,05	1,0	0,05	2,0
KB	0,005	1,0	0,005	0,8
NCI-H2110	0,1	4,0	0,1	7,0

Ejemplo 30. Actividad antitumoral del conjugado huMOV19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC en ratones SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 1 x 107 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 (día 7 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en 4 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o **huMOV19-90** en 1, 3 o 5 µg/kg basándose en la concentración del compuesto **90** en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm^3 utilizando la fórmula V = longitud x ancho x altura x ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

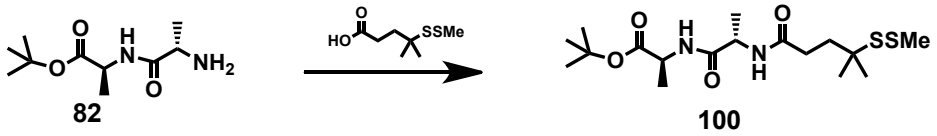
Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

T/C (%) = volumen tumoral medio de los tratados / volumen tumoral medio de control x 100.

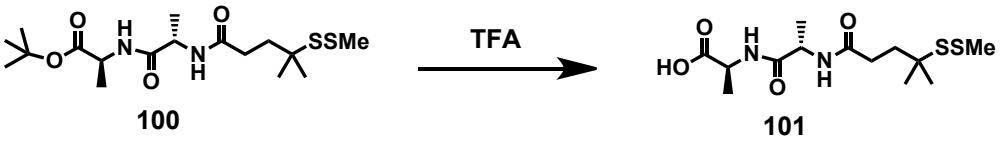
Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm3. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm3). De acuerdo con las normas NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C <10 % se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra 14, el conjugado **huMOV19-90** es activo en dosis de 3 µg/kg y es altamente activo en dosis de 5 µg/kg.

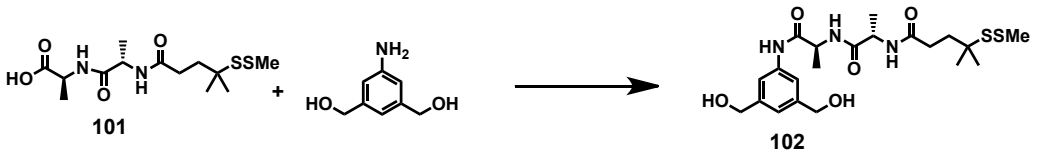
Ejemplo 31. Síntesis del compuesto 107



Etapa 1: Se disolvieron el compuesto **82** (500 mg, 2,31 mmol), ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (449 mg, 2,31 mmol), EDC·HCl (465 mg, 2,43 mmol), HOBt (354 mg, 2,31 mmol) y DIPEA (0,81 mL, 4,62 mmol) en DMF (7,7 mL) y se agitó durante la noche hasta que la reacción se completó. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado, cloruro de amonio saturado y dos veces con agua. La capa orgánica se secó y se concentró in vacuo para proporcionar el compuesto **100** (875 mg, el 96 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8,15 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 8,02 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 4,26-4,33 (m, 1H), 4,03-4,12 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,18-2,22 (m, 2H), 1,76-1,80 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,24 (s, 6H), 1,24 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,19 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).

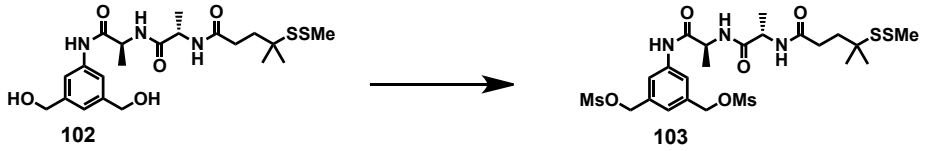


Etapa 2: se agregaron TFA (2,6 ml) y agua (0,17 ml) al compuesto puro **100** (875 mg, 2,23 mmol) y se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó. La reacción se diluyó y se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo para obtener un aceite pegajoso. Luego se diluyó con acetonitrilo y agua, se congeló y se liofilizó para proporcionar el compuesto **101** (1 g, el 100 % de rendimiento) como un sólido blanquecino que se utilizó sin purificación adicional. LCMS = 3,99 min (método de 8 min). MS (m/z): 337,0 $(M + 1)^+$.

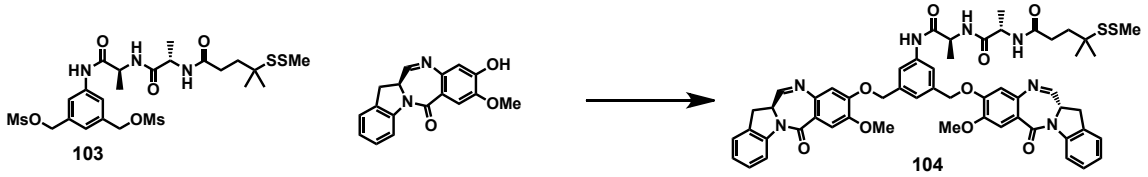


Etapa 3: Se disolvieron el compuesto **101** (923 mg, 1,65 mmol) y (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (240 mg, 1,57 mmol) en DMF (5,2 ml). Se agregaron EDC·HCl (601 mg, 3,13 mmol) y DMAP (96 mg, 0,78 mmol) a temperatura ambiente y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se diluyó la reacción con acetato de etilo y se lavó con agua tres veces.

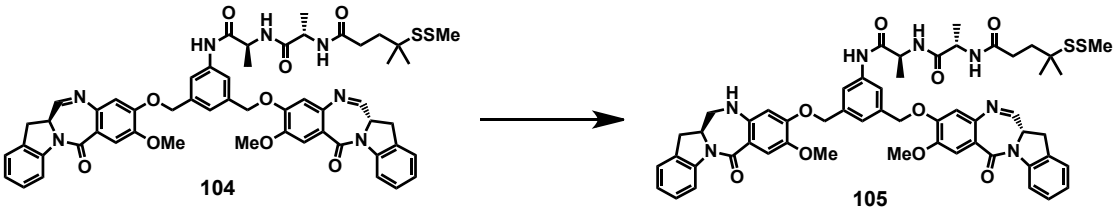
La capa orgánica se secó, se concentró in vacuo y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **102** (150 mg, el 20 % de rendimiento). LCMS = 3,91 min (método de 8 min). MS (m/z): 472,2 $(M + 1)^+$. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD): δ 9,69 (s, 1H), 8,21 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 8,18 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,52 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 4,58 (s, 4H), 4,44-4,48 (m, 1H), 4,29-4,32 (m, 1H), 3,34 (s, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,34-2,40 (m, 2H), 1,90-1,95 (m, 2H), 1,43 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,30 (s, 6H).



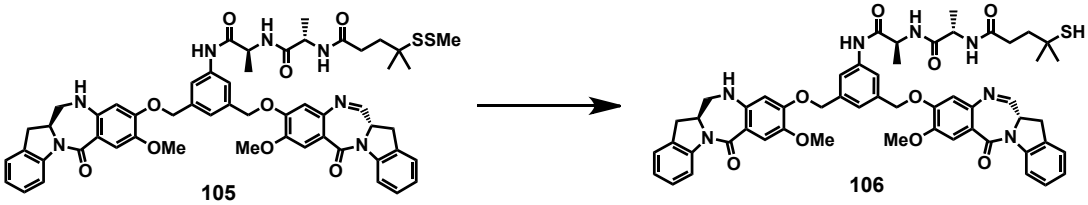
Etapa 4: Se preparó el compuesto **102** de forma similar al compuesto **94** en el ejemplo 9. El material bruto se secó en vacío alto para proporcionar el compuesto **103** (174 mgs, el 101 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS = 4,95 min (método de 8 min).



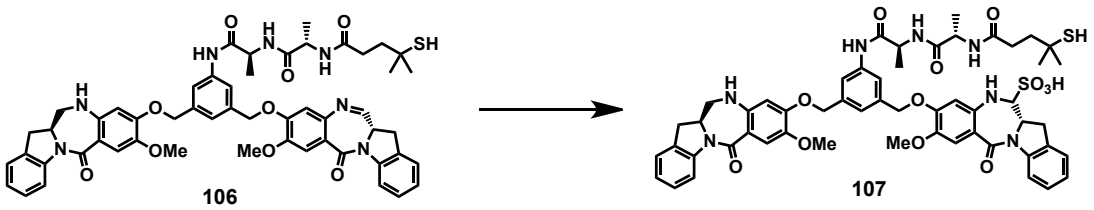
Etapa 5: Se preparó el compuesto **103** de forma similar al compuesto **57** en el ejemplo 7. El sólido bruto contenía compuesto **104** (203 mg, el 44 % de rendimiento, el 60 % de pureza) que se utilizó sin purificación adicional. LCMS = 5,68 min (método de 8 min). MS (m/z): 1024,3$(M + 1)^+$.



Etapa 6: Se preparó el compuesto **104** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El residuo bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH_3CN/H_2O, gradiente, entre el 50% y el 65%) para proporcionar monoimina compuesto **105** como un sólido (22 mg, el 16% de rendimiento, el 90 % bruto). LCMS = 6,00 min (método de 8 min). MS (m/z): 1027,3$(M + 1)^+$.



Etapa 7: Se disolvió el compuesto **106** en THF (0,5 mL) y ACN (0,23 mL) en temperatura ambiente. Luego se preparó de forma similar al compuesto **98** en el ejemplo 9. La mezcla se agitó hasta completarse y luego se diluyó con DCM y agua DI. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar el tiol bruto, el compuesto **106** (21 mg, el 100 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente reacción. LCMS = 5,67 min (método de 8 min). MS (m/z): 980,4 $(M + 1)^+$.



Etapa 8: El compuesto **106** (21 mg, 0,021 mmol) se suspendió en 2-propanol (1428 µl) y agua (714 µl). Se agregó metabisulfito de sodio (22,30 mg, 0,214 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta completarse. La mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo/agua, se congeló y se liofilizó. El polvo blanco resultante se purificó mediante RPHPLC (columna

C18, CH_3CN/H_2O, gradiente, entre el 20 % y el 40 %) y las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto **107** (5,3 mg, el 23 % de rendimiento). LCMS = 5,67 min (método de 8 min). MS (m/z): 1060,2 $(M - 1)^-$.

Ejemplo 32. Preparación del conjugado **huMOV19-sulfo-SPDB-107** (o **huMOV19-107**)

Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 1,95 mM del compuesto **107** y 1,5 mM de enlazador sulfo-SPDB en amortiguador succinato (pH 5) : DMA (30 : 70) se incubó durante 6 h antes de la adición de un exceso de 7 veces de **107**-sulfo-SPDB-NHS a una reacción que contenía 4 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM HEPES pH 8,5 (87:13, agua: DMA). La solución se dejó conjugar durante la noche a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 10 mM de Tris, 80 mM de NaCl, 50 uM de disulfito, el 3,5 % de sacarosa, el 0,01 % de amortiguador de formulación Tween-20 pH 7,6 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-

A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **107** unidas por anticuerpo (mediante UV/Vis y SEC utilizando coeficientes de extinción molar $\varepsilon_{330\ nm}$= 15.484 $cm^{-1}M^{-1}$ y $\varepsilon_{280\ nm}$= 30, 115 $cm^{-1}M^{-1}$ para el compuesto **107**, y $\varepsilon_{280\ nm}$= 201.400 $cm^{-1}M^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 95% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 1,1 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 16.

Ejemplo 33. Actividad antitumoral del conjugado huML66-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H1703 NSCLC en ratones SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 5 x 10^6 células tumorales de NCI-H1703 suspendidas en 0,2 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 (día 16 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en 4 grupos de 6 ratones cada

uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,1 ml/ratón) o conjugado **huML66-90** en 5, 20 o 50 µg/kg basándose en la concentración del compuesto **90** en el día 1 (día 17 después de la inoculación).

Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm^3 utilizando la fórmula V = longitud x ancho x altura x ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

T/C (%) = volumen tumoral medio de los tratados / volumen tumoral medio de control x 100.

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm^3. Se determinó el volumen tumoral

medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm^3). De acuerdo con las normas NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C <10 % se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra en la figura 17, el conjugado **huML66-90** es altamente activo en 20 µg/kg y 50 µg/kg, con 20 µg/kg como dosis eficaz mínima (MED).

Ejemplo 34. Farmacocinética del conjugado huMov19-90 de dosis única en ratones CD-1 hembra

Los ratones CD-1 hembra, de 7 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Los ratones recibieron una administración IV única del conjugado **huMov19-90** como una inyección en bolo intravenosa única mediante una vena lateral de la cola. Cada ratón recibió una dosis de 2,5 mg/kg en base a Ab. La dosis y el volumen inyectado se individualizaron sobre la base del peso corporal de cada ratón. Se llevaron a cabo inyecciones utilizando una jeringa de 1,0 mL equipada con un aguja calibre 27, de ½ pulgada. En el minuto 2 y 30, en las horas 2, 4 y 8, y en los días 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la administración del conjugado **huMov19-90**, se

anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano y se recogió aproximadamente 150 µL de sangre de los ratones a través del seno sanguíneo retroorbital derecho en un tubo capilar heparinizado. En cada punto de tiempo (entre 0 y 21 días), se recogió sangre de los tres ratones en un grupo. A su vez, se tomaron muestras de sangre de los grupos; de modo que los ratones en el conjunto no se le tomaron muestras de sangre más de dos veces en un período de 24 horas. En punto de tiempo final, 28 días después de la administración, todos los ratones se incluyeron para la recolección de muestras. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el plasma. Se transfirió 30 µl de plasma a tubos de microcentrífuga etiquetados individuales para cada muestra y punto de tiempo, y luego se almacenó y se congeló a -80 °C para permitir el análisis posterior mediante ELISA para determinar las concentraciones de Ab total (Ab no conjugado y conjugado intacto) y el conjugado intacto utilizando un anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina. Tal como se muestra en la figura 18, el conjugado **huMov19-90** tiene depuración similar a la del anticuerpo.

Ejemplo 35. Enriquecimiento de catabolitos mediante captura

por afinidad con resina de proteína A

Se cultivaron células KB con expresión del receptor α de folato (FRα) en 5 × T150 placas de cultivo tisular. Se incubó una cantidad de saturación de FRα dirigido al conjugado **huMov19-90** con células KB durante 24 horas a 37 °C en una incubadora humidificada amortiguada con 5 % de CO_2. Después de 24 horas, se recogió el medio que contenía catabolitos de eflujo celular y se agrupó para el siguiente ensayo.

Se unió una cantidad saturante de anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina a una suspensión de resinas de proteína A mediante incubación durante la noche a 4 °C. Se incubó 1 mL de complejo de proteína A unida previamente/anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina con 25 mL de medio en un rotador de extremo a extremo durante varias horas. Se centrifugaron suavemente las resinas a 1000 rpm y se decantó el sobrenadante. Las resinas de proteína-A/anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina unidas a los catabolitos se lavaron con PBS. Se liberaron los catabolitos a la fase orgánica mediante extracción de acetona. Los catabolitos se secaron al vacío durante la noche hasta que se evaporó completamente la solución

orgánica. Se reconstituyeron los catabolitos con 20 % de acetonitrilo en agua y se analizaron mediante LC/MS.

Análisis MS

Se identificaron los catabolitos celulares mediante UHPLC/MS/MS utilizando espec. de masas de alta resolución Q-Exactive (Thermo). Se utilizaron los cromatogramas iónicos extraídos (XIC) para identificar y caracterizar los catabolitos de células diana. Se identificaron todas las especies de catabolitos que contenían las firmas de masas de indolinobenzodiazepina características (286 m/z) (véase las figuras 19A y 19B).

Ejemplo 36. Actividad antitumoral de huMov19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC, xenoinjertos endometriales Hec-1b y xenoinjertos endometriales Ishikawa en ratones CB.17 SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inoculó un Cohorte de ratones con 1 x 10^7 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Se inoculó

un segundo Cohorte de ratones con 1 x 10^7 de células tumorales Hec-1b suspendidas en 0,1 ml de medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Se inoculó un tercer Cohorte de ratones con 1 x 10^7 células tumorales de Ishikawa suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 (NCI-H2110 en el día 7, Hec-1b en el día 7 y Ishikawa en el día 17 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en grupos de 6 ratones cada uno.

Los ratones en el experimento de xenoinjerto NCI-H2110 recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 1, 3 o 5 µg/kg basándose en la concentración de fármaco en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Los ratones en el experimento de xenoinjerto Hec-1b recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 10 o 30 µg/kg o el conjugado de control no dirigido chKTI-90 en 30 µg/kg basándose en la

concentración de fármaco en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Los ratones en el experimento de xenoinjerto Ishikawa recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 10 o 30 µg/kg o el conjugado de control no dirigido chKTI-90 en 30 µg/kg basándose en la concentración de fármaco en el día 1 (día 18 después de la inoculación).

Para todos los experimentos, se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm^3 utilizando la fórmula V = longitud x ancho x altura x ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

T/C (%) = volumen tumoral medio de los tratados / volumen

tumoral medio de control x 100.

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm^3. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm^3). De acuerdo con las normas NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C <10 % se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra en la figura 22, el conjugado huMov19-90 era inactivo en el modelo de xenoinjerto NCI-H2110 en una dosis de 1 µg/kg, activo en una dosis de 3 µg/kg con un T/C del 13 % y 1/6 PRs y altamente activo en una dosis de 5 µg/kg con un T/C del 2 %, 6/6 PRs y 4/6 CRs.

Tal como se muestra en la figura 23, el conjugado huMov19-90 era activo en el modelo de xenoinjerto Hec-1b en una dosis de 10 µg/kg con un T/C del 15% y 1/6 PRs y altamente activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 9%, 6/6 PRs y 6/6 CRs. El conjugado de control no dirigido chKTI-90 era activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 34 %.

Tal como se muestra en la figura 24, el conjugado huMov19-90 era activo en el modelo de xenoinjerto Hec-1b en una dosis de 10 µg/kg con un T/C del 27%, 6/6 PRs y 6/6 CRs y activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 15%, 6/6 PRs y 6/6 CRs. El conjugado de control no dirigido chKTI-90 era activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 24 % y 4/6 PRs.

Ejemplo 37. Actividad antitumoral de huMov19-107 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC, en ratones CB.17 SCID hembra

Se realizó la actividad antitumoral in vivo de huMOV19-107 en ratones SCID de acuerdo con los protocolos descritos en el ejemplo 30 anterior. Tal como se muestra en la figura 25, el conjugado **huMov19-107** era altamente activo en dosis de 10 µg/kg y 6/6 CRs.

Ejemplo 38. Afinidad de unión del conjugado CD123-90

Se evaluó la afinidad de unión del conjugado ADC de un anticuerpo anti-CD123 humanizado ejemplar, anticuerpo huCD123-6Gv4.7S3, y se comparó con el anticuerpo no conjugado correspondiente mediante citometría de flujo utilizando células HNT-34. Las células HNT-34 (5×10^4 células por muestra)

se incubaron con diversas concentraciones del ADC y el anticuerpo huCD123-6Gv4.7S3 no conjugado en 200 µL de amortiguador FACS (medio DMEM complementado con el 2 % de suero de cabra normal). Luego las células se sedimentaron, se lavaron dos veces y se incubaron durante 1 h con 100 µL de anticuerpo IgG de cabra antihumano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Laboratory). Las células se sedimentaron una vez más, se lavaron con amortiguador FACS y se suspendieron nuevamente en 200 µl de PBS que contenía formaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador multipocillos de HTS o un citómetro de flujo de barrido FACS y se analizó utilizando CellQuest Pro (todos de BD Biosciences, San Diego, EUA). Para cada muestra la intensidad geo promedio de fluorescencia para FL2 se calculó y se graficó con la concentración de anticuerpo en una gráfica semilogarítmica. Se generó una curva de respuesta a la dosis mediante regresión no lineal y se calculó el valor de EC50 de cada curva, que corresponde a la constante de disociación aparente (Kd) de cada anticuerpo, utilizando GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA).

Tal como se muestra en la figura 26, la conjugación solo afectó moderadamente la afinidad de unión del anticuerpo anti-CD123 ejemplar.

Ejemplo 39. Actividad citotóxica *in vitro* para huCD123-90

SE midió la capacidad de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de huCD123-6, un anticuerpo anti-CD123, de destruir células que expresan CD123 en su superficie celular utilizando ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Se cultivaron las líneas celulares en medio de cultivo según lo recomendado por el proveedor de las células (ATCC o DSMZ). Se añadieron las células, 2.000 a 10.000 en 100 µL del medio de cultivo a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo plano. Para bloquear los receptores Fc en la superficie celular, se complementó el medio de cultivo con 100 nM de anticuerpo chKTI (un anticuerpo del mismo isotipo). Se diluyeron los conjugados en el medio de cultivo utilizando una serie de diluciones de 3 veces y se añadieron 100 µL por pocillo. Para determinar la contribución de la citotoxicidad independiente de CD123, se añadió el bloque CD123 (p. ej., 100 nM de anticuerpo chCD123-6) a algunos pocillos antes que los conjugados. Se incluyeron en cada placa

de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los conjugados, así como pocillos que contenían el medio solo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada punto de datos. Se incubaron las placas a 37 °C en una incubadora humidificada con 6 % de CO_2 durante 4 a 7 días. Se determinó la cantidad relativa de células viables en cada pocillo utilizando el Kit de conteo de células 8 basado en WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD). Se calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas). Se graficó la fracción superviviente de células contra la concentración de conjugado en gráficas semilogarítmicas.

Se utilizaron quince líneas celulares positivas de CD123 de origen diferente (AML, B-ALL, CML y NHL) en el estudio (tabla 4). La mayoría de las líneas celulares derivaron de pacientes portadores de un tumor maligno con al menos un factor de pronóstico negativo (p. ej., sobreexpresión de P-

glicoproteína, sobreexpresión de EVI1, alteraciones de p53, mutación de DNMT3A, duplicación de tándem interno de FLT3). Los conjugados demostraron alta potencia en estas líneas celulares con valores de IC50 que variaban entre sub-pM y nM bajo (tabla 4).

Tabla 4. Citotoxicidad in vitro del conjugado **huCD123-6-90** contra líneas celulares positivas de CD123 de origen diferente

Línea celular	Origen	Factor de pronóstico negativo	IC_{50} (M)
THP1	AML	Eliminación de p53	6,7E-12
SHI-1	AML	Alteraciones del gen p53	1,3E-11
KO52	AML	mutante p53, sobreexpresión de Pgp	1,4E-11
KASUMI-3	AML	EVI1 y sobreexpresión de Pgp	9,8E-12
KG-1	AML	mutante p53, sobreexpresión de Pgp	2,2E-10
OCI-AML2	AML	Mutación de DNMT3A	8,8E-11
HNT-34	AML	Sobreexpresión de MECOM (EVI1)	2,0E-12
MV4-11	AML	Duplicación de tádem interno de FLT3	5,6E-13
MOLM-13	AML	Duplicación de tádem interno de FLT3	4,9E-13
EOL-1	AML		2,5E-12
MOLM-1	CML	EVI1 y sobreexpresión de Pgp	2,9E-11
KOPN8	B-ALL		1,1E-11
JM-1	B-ALL		2,4E-11
KCL-22	CML		3,0E-11
Granta519	NHL		1,2E-12

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, sitios de internet y números de acceso/secuencias de bases de datos (incluyendo tanto secuencias de polinucleótidos como de polipéptidos) citadas en la presente se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad a todos los efectos en la misma medida que si se indicara que cada publicación, patente, solicitud de patente, sitio de internet o número de acceso/secuencia de bases de datos individuales se incorpora de manera específica e individual mediante referencia.

Señor
Director de la Dirección de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo
E. S. D.

Re.: Expediente **No. NC2017/0003011**
Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para: **"UN COMPUESTO DE ÁCIDO 3-((3-(((8-METOXI-6-OXO-11,12,12A, 13-TETRAHIDRO-6H-BENZO[5,6][1,4]DIAZEPINO[1,2-A]INDOL-9-IL)OXI)METIL)-5-(((8-METOXI-6-OXO-12A, 13-DIHIDRO-6H-BENZO [5,6][1,4] DIAZEPINO [1,2-] INDOL-9-YL)OXI)METIL)FENIL) AMINO) PÉPTIDO) ALQUILCARBOXÍLICO O UN DERIVADO DE ESTE"**
Solicitantes: **IMMUNOGEN INC.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante del asunto citado en la referencia, en atención a su oficio **No.7726** notificado en junio 25 de 2018 para el cual se solicitó plazo dentro del término legal**,** me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Modificación a las Reivindicaciones

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 y en vista de las observaciones realizadas por el examinador, se presenta en esta oportunidad un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 10 reivindicaciones. Con respecto al nuevo pliego reivindicatorio, se ponen de presente las siguientes modificaciones y aclaraciones:

- Las reivindicaciones 11-21 no han sido incluidas en el nuevo pliego reivindicatorio.

- La reivindicación 1 ha sido modificada para definir aún más los compuestos reivindicados tal como están representados en la fórmula estructural (I-1), que incorporan las definiciones de L'', L''', X', Y', A, A', R_6, R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4 y R_4' en la fórmula estructural (I) de la reivindicación 1 actualmente en trámite. Asimismo, L' se limitó para que sea representada por la fórmula (B1) y las definiciones de R_a y R_b se incorporaron a la fórmula. Asimismo, Y se modificó para que sea $-SO_3M$ solamente cuando la línea doble = entre N y C representa un enlace simple. Por otro lado, el COE variable se definió adicionalmente

incorporando los grupos reactivos de éster específicos citados en la reivindicación 2 actualmente en trámite. Las reivindicaciones 2-10 se modificaron para que sean consistentes con las modificaciones efectuadas a la reivindicación 1.

- El examinador afirma que las reivindicaciones 5-6 y 13-14 no son claras porque repiten materia de manera innecesaria ya que ambas definen la secuencia de aminoácidos de P. El examinador sugiere incluir estas secuencias en una sola reivindicación.

  A este respecto, se pone de presente que las reivindicaciones 13 y 14 no han sido incluidas en el nuevo pliego reivindicatorio y por lo tanto, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

- El examinador sostiene que las reivindicaciones 1-2, 4-17 y 21 no están totalmente sustentadas porque la memoria descriptiva solamente revela ciertas definiciones para L', L", L'", X, X', Y, Y', R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4 y R_4'.

  A este respecto, vale la pena resaltar que las reivindicaciones 11 a 21 han sido eliminadas la reivindicación 1 independiente se modificó para limitar de manera significativa su alcance. En particular, se modificó L' en la reivindicación 1 para que esté representada por la fórmula (B1) solamente, en la cual se incorporan las definiciones de R_a y R_b. Asimismo, se modificó la definición de Y para que sea -SO_3M solamente cuando la línea doble ═ entre N y C representa un enlace simple. Asimismo, la reivindicación 1 se modificó para definir el compuesto tal como lo representa la fórmula (I-1), incorporando las definiciones de L", L'", X', Y', A, A', R_6, R_1, R_1', R_2, R_2', R_3, R_3', R_4 y R_4' en la fórmula estructural (I) como figura en la reivindicación 1 actualmente en trámite. Por consiguiente, el alcance de la reivindicación 1 modificada representa una generalización razonable de los compuestos ejemplificados y tiene, por lo tanto, sustento suficiente en la memoria descriptiva.

2. Modificación a la descripción

De acuerdo con el examinador, la descripción no es clara porque las últimas estructuras de las páginas 174, 187, 192, 194-195, 200, 204, 206, 210 y 247 están incompletas. Por lo tanto, se presente un nuevo pliego descriptivo corrigiendo las imágenes de las estructuras de estas páginas. Por lo tanto, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

3. Título

Se modifica el título de la presente solicitud, de la siguiente manera:

Un compuesto de ácido 3-((3-(((8-metoxi-6-oxo-11,12,12a, 13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((8-metoxi-6-oxo-12a, 13-dihidro-6H-benzo [5,6][1,4] diazepino [1,2-] indol-9-yl)oxi)metil)fenil) amino) péptido) alquilcarboxílico o un derivado de este.

4. Unidad de Invención

Con el fin de superar la objeción formulada por unidad de invención, mi representada ha eliminado las reivindicaciones 11 a 20 del nuevo pliego reivindicatorio. Sin embargo, procederá a presentar una solicitud divisional para la materia eliminada.

5. Nivel inventivo

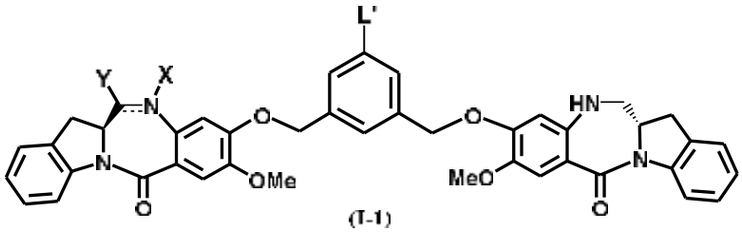
El examinador rechaza las reivindicaciones en trámite porque supuestamente carecen de actividad inventiva frente al D1 y D2. El examinador considera que el D1 es el arte previo más cercano porque "revela compuestos derivados de (1-aminopéptido-(Bis3,5-(8-metoxi-6-oxo-11, 12, 12a, 13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil))fenil que forman un conjugado con un anticuerpo del receptor anti-folato para el tratamiento del cáncer". El examinador reconoce que la invención de la reivindicación 1 difiere del compuesto descrito en el D1 en que "el compuesto reivindicado tiene un radical fenil-NH-P-C(=O)-alquil-COOH mientras que el compuesto divulgado en el documento D1 tiene un radical fenil-NH-P-alquil–COOH".

Sin embargo, concluye que no hay ningún efecto técnico asociado a la presencia de –C(=O)- dentro de la estructura de los compuestos reivindicados. Asimismo, asevera que el D2 divulga compuestos derivados de benzodiazepina que tienen un grupo fenil-péptido-C(=O) en sus estructuras (resumen, páginas 110-112, párrafo [246-252], página 87, tabla 4, página 206, reivindicación 150 y figura 26) y, en consecuencia, la persona con experiencia en la materia tendría la sugerencia de "unir un grupo -C(=O)- al péptido revelado en la estructura del compuesto divulgado en el documento D1 para arribar al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud".

El solicitante no comparte la opinión del examinador al menos por los siguientes motivos. Veamos:

5.1 Los compuestos reivindicados por el solicitante son dímeros de benzodiazepina que tienen una funcionalidad imina (C=N) y una funcionalidad amina (C-N).

Solamente para acelerar la tramitación y sin dar por sentado el mérito de los rechazos, se modificó la reivindicación 1 para definir aún más los compuestos reivindicados tal como están representados por la fórmula (I-1) que se muestra a continuación:



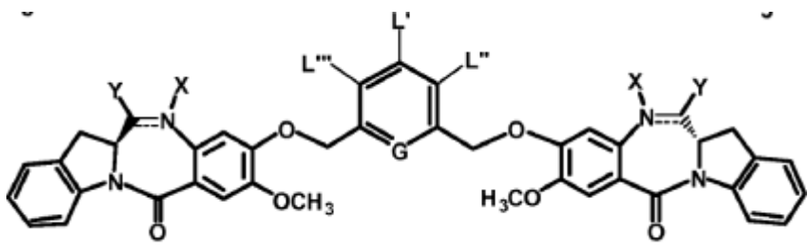
(I-1)

En donde L' está representada por $-NR_5-PC(=O)-(CH_2)_m-J$, R_5 es H o Me, P es un péptido que contiene de 2 a 5 residuos de aminoácidos y J es -COOH o un COE éster reactivo tal como se define en la reivindicación.

Como se muestra en la fórmula (I-1), los compuestos reivindicados por el solicitante son compuestos de dímeros de benzodiazepina que tienen dos monómeros de benzodiazepina diferentes. El monómero del lado izquierdo que lleva el grupo -C(Y) = N (X)- tiene una funcionalidad imina (C= N) cuando la línea doble = es un enlace doble, X está ausente e Y es H. Alternativamente, el monómero izquierdo tiene una funcionalidad imina enmascarada cuando la línea doble = es un enlace simple e Y es un grupo saliente $-SO_3M$ que puede conducir a la formación de un doble enlace. Por el contrario, el monómero del lado derecho tiene una funcionalidad amina (C-N). Por lo tanto, los compuestos reivindicados poseen una funcionalidad imina y una funcionalidad amina.

5.2 El D1 describe dímeros de benzodiazepina que tienen dos funcionalidades imina y este documento, solo o en combinación con el D2, no proporciona motivación alguna para arribar a los compuestos reivindicados por el solicitante.

Por el contrario, el D1 divulga esencialmente dímeros de benzodiazepina con dos funcionalidades imina. Concretamente, como se muestra en la fórmula (XV) del D1 citada por el examinador y que se reproduce a continuación:



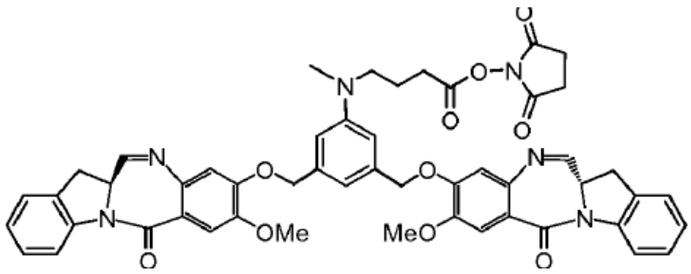
(XV)

Los dímeros de benzodiazepina del D1 tienen dos funcionalidades imina, donde las líneas dobles = entre N y C en el monómero del lado izquierdo y el monómero del lado derecho son, ya sea, (1) ambos enlaces dobles, o (2) ambos enlaces simples

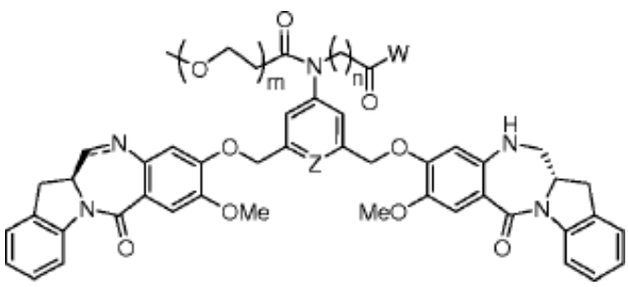
unidos a un grupo saliente Y que puede conducir a la formación de enlaces dobles en ambos monómeros.

Los compuestos del D1 citados por el examinador tienen por lo tanto dos funcionalidades imina. Por el contrario, los compuestos reivindicados por el solicitante son dímeros de benzodiazepina que tienen una funcionalidad imina y una funcionalidad amina.

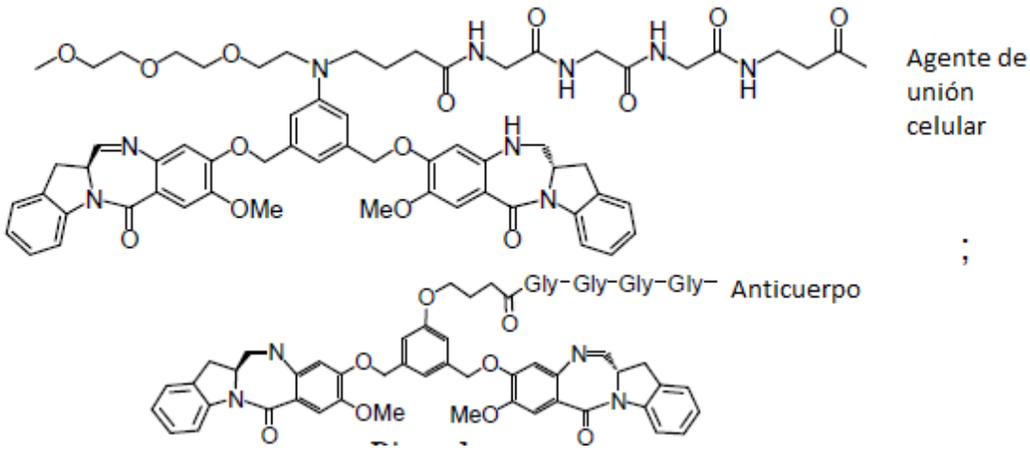
Asimismo, el examinador cita el compuesto 46 (estructura que se muestra a continuación) del D1 como el compuesto del arte previo más cercano a los compuestos reivindicados:



El compuesto 46 del D1 tiene un grupo -N(CH_3)-alquil-COE unido al anillo de fenilo (es decir, L' en la fórmula (I-1) de la presente reivindicación 1) mientras que los compuestos reivindicados por el solicitante tienen un grupo -NR_5-péptido-C(=O)-alquil-COOH (o COE) en la posición L'. El Examinador considera que la divulgación del D2 supera esta deficiencia del D1 y refiere que los siguientes compuestos divulgados en el D2 proporcionan la motivación para modificar el grupo -N(CH_3)-alquil-COE del D1 para llegar al grupo -NR_5-péptido-C(=O)-alquil-COOH (o COE) de los compuestos reivindicados por el solicitante.



W=péptido, Z=C



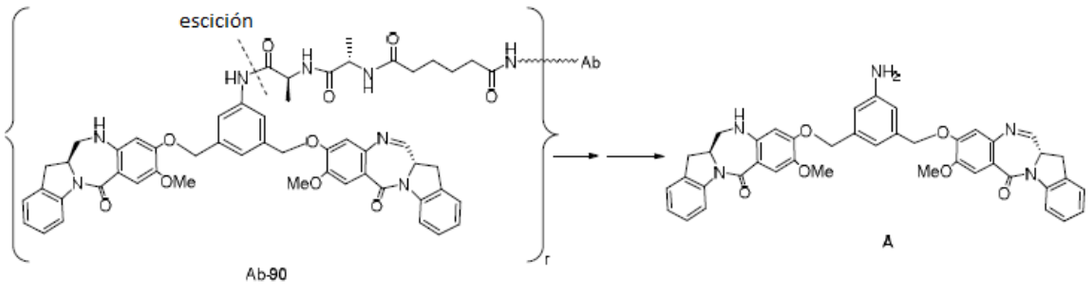
DÍMERO 1

<u>Ninguno</u> de los compuestos anteriores divulgados en el D2 tiene un péptido directamente unido al grupo fenilo a través de un grupo amina (es decir, un grupo -NR_5- para L' en la fórmula (B1) de la reivindicación 1). Por lo tanto, el D2 no proporciona ninguna enseñanza o motivación para modificar el compuesto del D1 insertando un grupo peptídico adyacente al grupo amino anilina que está unido al grupo fenilo como en el grupo L' de los compuestos reivindicados por el solicitante.

<u>5.3 El grupo L' de los compuestos reivindicados es esencial para la actividad de destrucción no especifica y para la potencia antitumoral de los conjugados de anticuerpo que comprenden los compuestos.</u>

El grupo L' representado por la fórmula (B1) en los compuestos reivindicados por el solicitante es una característica esencial que contribuye a la actividad de destrucción no específica fuerte y a la actividad antitumoral elevada que se observan en los conjugados de anticuerpos que comprenden los compuestos.

Sin estar unidos por el mecanismo, los conjugados de los compuestos reivindicados se pueden metabolizar dentro de las células diana mediante la escisión del enlace amida que conecta el péptido y el grupo anilina (es decir, fenil-NR_5-) para liberar un catabolito de compuesto A que contribuye a la destrucción no específica fuerte y a la actividad antitumoral elevada de los conjugados.



Esto se sustenta en el Ejemplo 35 de la solicitud que muestra la formación del compuesto A como un catabolito cuando las células KB se trataron con el conjugado Ab-**90**. Asimismo, se muestra que los conjugados del compuesto **90** presentan una actividad no específica fuerte (ver el ejemplo 23, Fig. 13) y una actividad antitumoral potente tanto *in vitro* como *in vivo* (ver los ejemplos 26, 28, 29, 30, 33, 36 y 39 y las figuras 6, 9-12, 13, 14, 17, 21, 22, 23 y 24). No es razonable esperar o predecir tal actividad de destrucción no específica y tal actividad antitumoral potente a partir de las enseñanzas del D1 y el D2.

En resumen, los compuestos reivindicados por el solicitante son compuestos de dímeros de benzodiazepina que tienen una funcionalidad imina y una funcionalidad amina. Por el contrario, los compuestos del D1 citados por el examinador son compuestos de dímeros de benzodiazepina que tienen dos funcionalidades imina. Asimismo, el D1 o el D2, solos o en combinación, no proporcionan ninguna enseñanza o motivación para que un experto en la materia modifique la porción L' del compuesto del D1 para arribar exitosamente a los compuestos reivindicados por el solicitante. Asimismo, la porción L' de los compuestos reivindicados es esencial para la actividad de destrucción no específica y para la actividad antitumoral que se observaron en los conjugados de anticuerpos que comprenden los compuestos reivindicados, lo cual no puede esperarse o predecirse de manera razonable a partir de las enseñanzas del D1 y el D2.

6. Conclusión

Teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en esta oportunidad y los argumentos que se presentan, es posible establecer que las reivindicaciones cumplen con los requerimientos de la Decisión 486.

7. Pago por concepto de un nuevo examen de la presente solicitud

De conformidad con la Resolución 3719 de 2016, el solicitante tiene derecho a que se realicen un máximo de 3 exámenes de patentabilidad (si así lo considera necesario la oficina nacional), siempre y cuando se soliciten y paguen en un periodo no superior a 18 meses, para patentes de invención.

Para el presente caso, la publicación se realizó en julio 11 de 2017, razón por la cual como se modifica el pliego reivindicatorio, se ha realizado el pago correspondiente por concepto de un nuevo examen de patentabilidad.

8. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 10 reivindicaciones.
- Comprobante de pago por concepto de un examen de patentabilidad adicional.

- Nuevo pliego descriptivo.

Señor Director,

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Bogotá
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.
MCA/mg

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
50 años 1968-2018

GOBIERNO DE COLOMBIA MINCIT

BANDEJA DE ENTRADA >

NC2017/0003011 - Patente PCT - Discutir el asunto

Salir

Información

NC2017/0003011

Patente PCT

DERIVADOS DE BENZODIAZEPINA CITOTÓXICOS

Requerimiento de Examen de Fondo

Discusión

Título	Examen de Fondo Patente solicitado
Fecha de creación	06 nov 2018
Estado	Cerrado

Mensajes

creacionescastellanosyco - 06 nov 2018

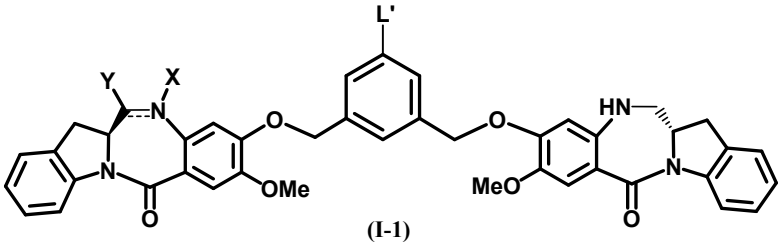
El Examen de Fondo de la Patente es solicitado

Cra 13 No. 27-00 pisos 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 PBX: (571)5870000 . Call center: (571)5920400 Línea gratuita nacional 01800-910165
www.sic.gov.co . e-mail: contactenos@sic.gov.co Bogotá D.C. - Colombia.
Política de privacidad | Política editorial | Créditos | Webmaster: contactenos@sic.gov.co ::: Todos los derechos reservados 2008 - 2018

Cerrar

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto citotóxico representado por la siguiente fórmula estructural:



(I-1)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

L' está representado por la siguiente fórmula:

$-NR_5-P-C(=O)-(CH_2)_m-J$ (B1);

R_5 es H o Me;

J es –COOH o –COE, donde –COE representa un éster reactivo seleccionado entre éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxi sulfosuccinimida, nitrofenil ester, dinitrofenil ester, sulfo-tetraflurofenil ester, y pentafluorofenil ester;

m es un entero de 1 a 6;

P es un péptido que contiene entre 2 y 5 residuos de aminoácidos;

la doble línea = entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble, X está ausente e Y es –H, y cuando es un enlace simple, X es –H, Y es$-SO_3M$; y

M es H, Na^+ o K^+.

2. El compuesto de la reivindicación 1 caracterizado porque J es COE, seleccionado de éster de N-

hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxisulfosuccinimida, éster de nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de sulfo-tetraflurofenilo y éster de pentafluorofenilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 caracterizado porque el grupo reactivo es un éster de N-hidroxisuccinimida.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 caracterizado porque $-(CH_2)_m-$ es $-(CH_2)_{m''}-C(Me_2)-$ y m″ es un entero entre 1 y 5.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 caracterizado porque P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Lle-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosil-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met y Met-Ala.

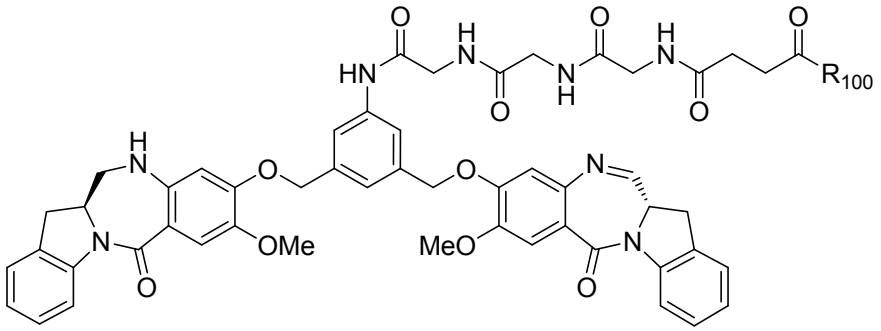
6. El compuesto de la reivindicación 5 caracterizado porque P es Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala y D-Ala-D-Ala.

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 caracterizado porque la línea doble = entre N y C representa un enlace doble.

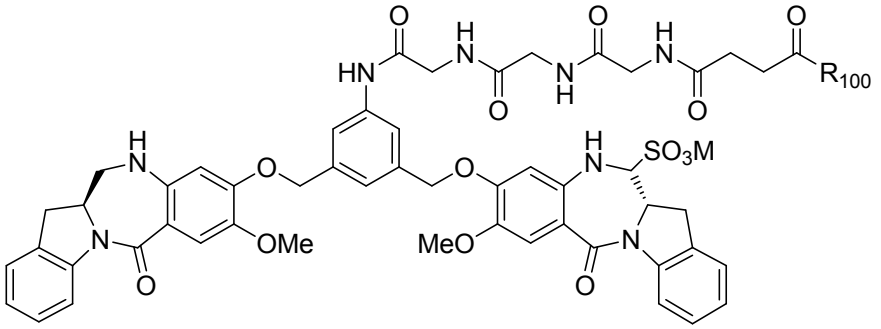
8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6

caracterizado porque la línea doble = entre N y C representa un enlace simple, X es –H; e Y es $-SO_3M$.

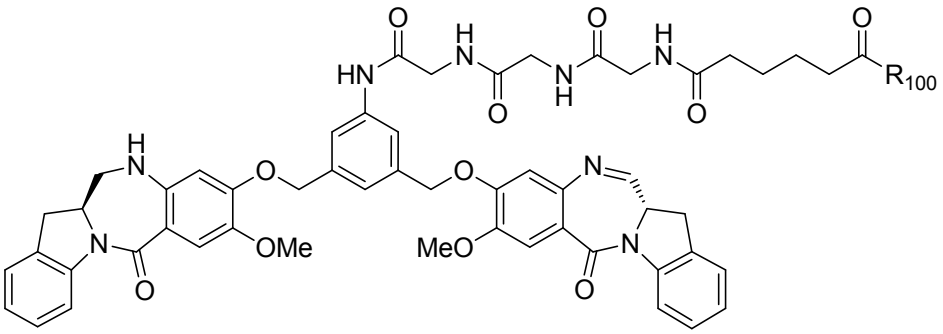
9. El compuesto de la reivindicación 1 caracterizado porque el compuesto se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:



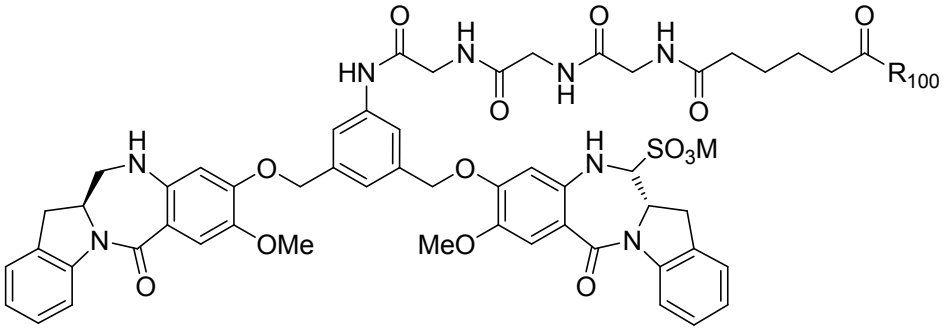
;



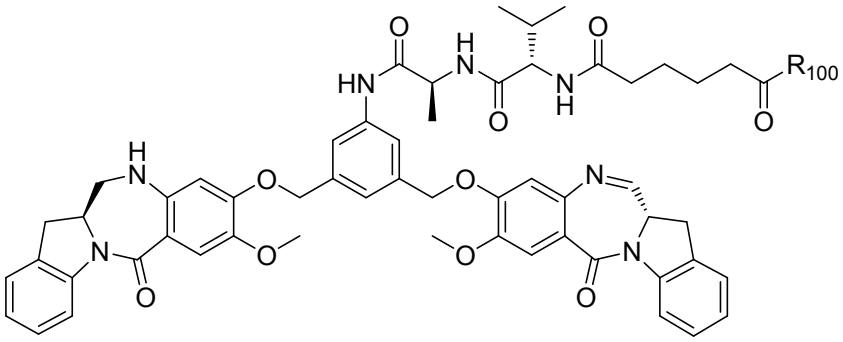
;



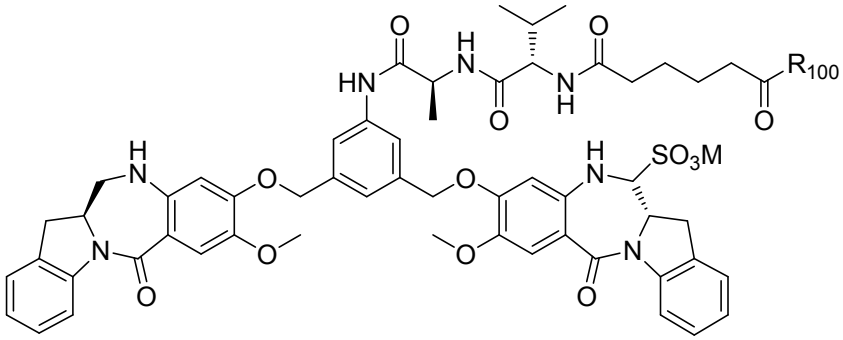
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
H
N
O
R100
H
N
O
O
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

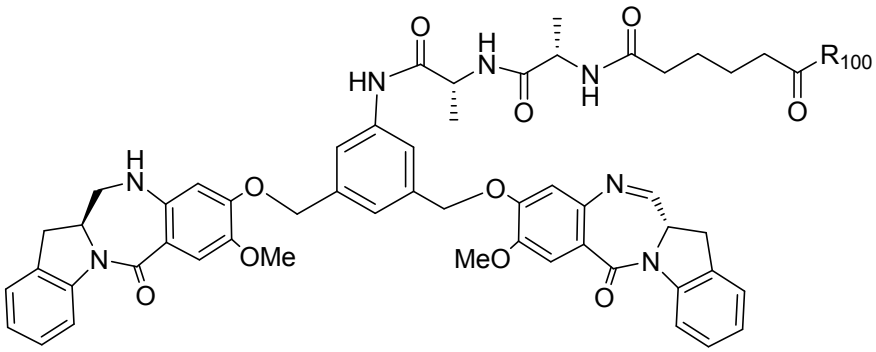
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
H
N
O
O
N
N
O
O
O
O
N

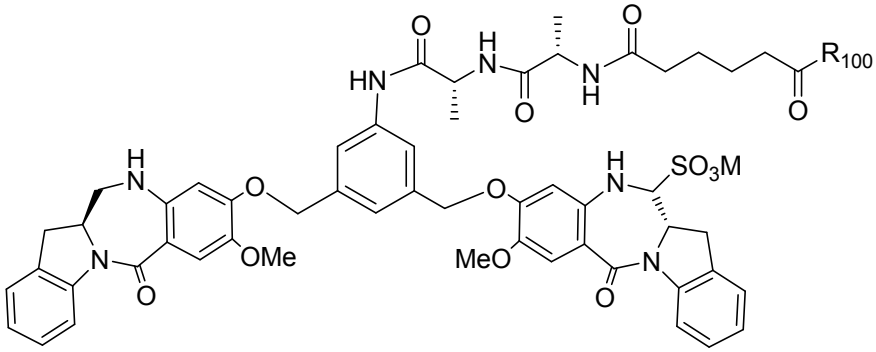
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
H
N
O
O
SO3M
N
N
O
O
O
O
N

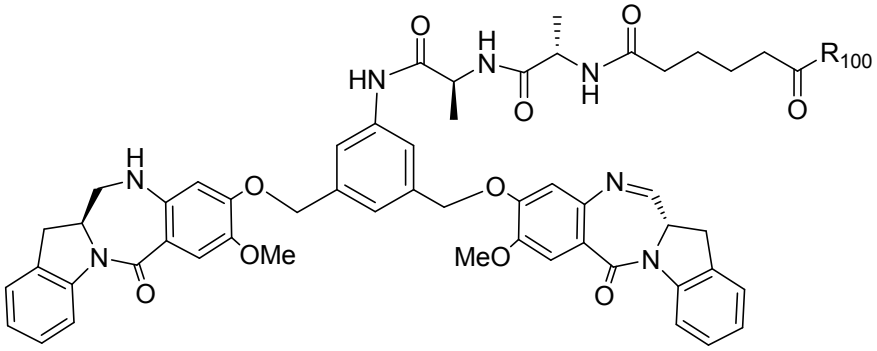
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
N
O
O

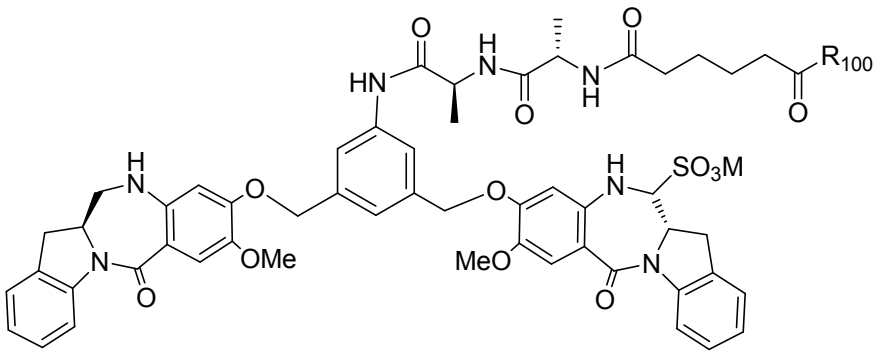
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
H
N
O
O
SO3M
N
OMe
MeO
N
O
O

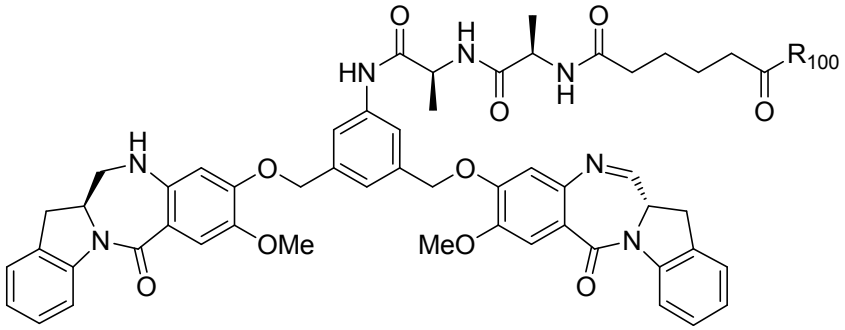
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O
N

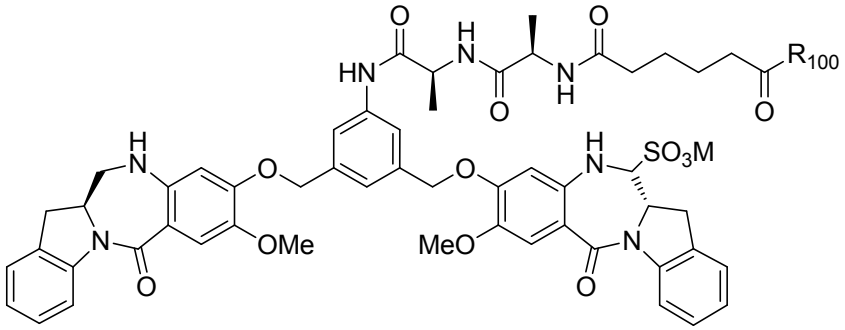
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
O
O
N

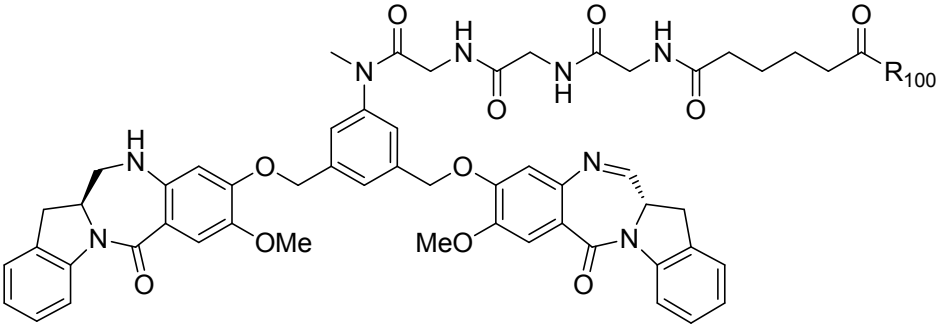
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
N
N
OMe
MeO
O
O
N

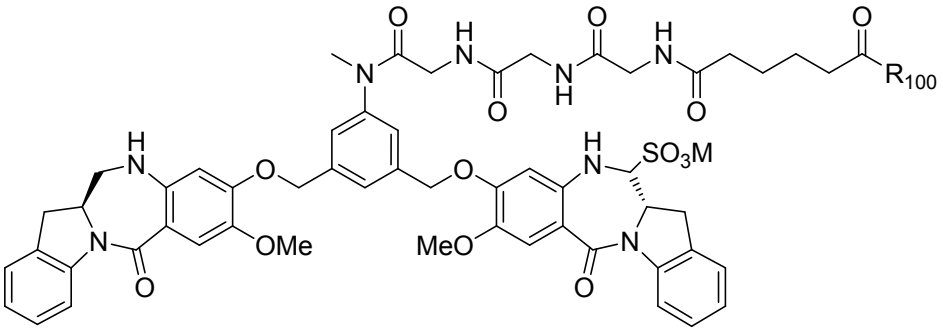
;


HN
O
H
N
O
N
H
O
R100
O
H
N
O
O
H
N
SO3M
N
OMe
MeO
O
O
N

;

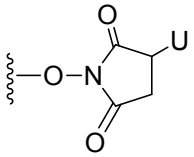


;

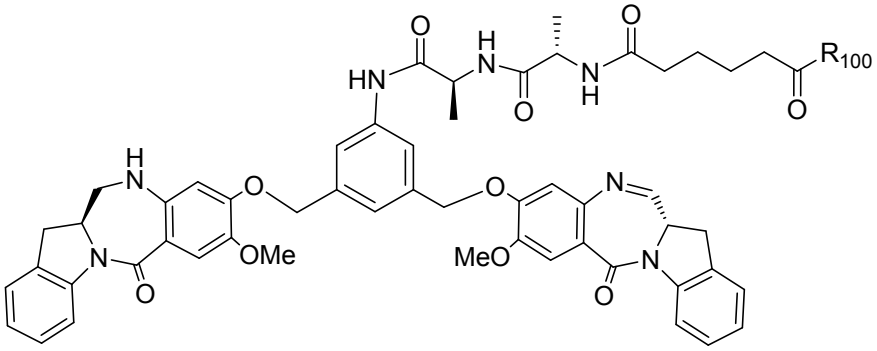


;

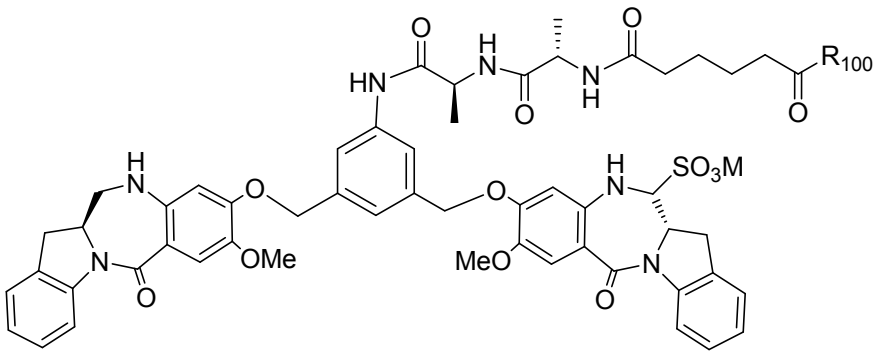
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

R_{100} es –OH o  y U es –H o SO_3M.

10. El compuesto de la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto está representado por la siguiente fórmula:



; o



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.