Descripción

Título de la Invención: DERIVADO DE PIRROLOBENZODIAZEPINA INMUNOCONJUGADO

Campo de la invención

[0001]

La presente invención hace referencia a un fármaco inmunoconjugado útil como un fármaco antitumoral, el fármaco inmunoconjugado que tiene un anticuerpo capaz de dirigirse a células tumorales y un derivado de pirrolobenzodiazepina que se conjugan entre sí a través de una fracción de estructura enlazadora.

Antecedentes del arte previo

[0002]

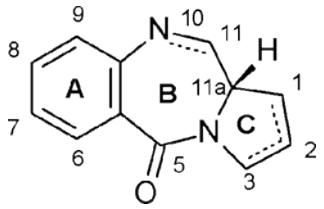
Los fármacos inmunoconjugados (ADC) tienen un fármaco con actividad citotóxica conjugado con un anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas y puede llevar a cabo internalización celular del antígeno a través de la unión. Los ADC pueden administrar el fármaco a células cancerosas de manera efectiva y, por lo tanto, se espera que causen la acumulación del fármaco dentro de las células cancerosas y las destruya.

Por ejemplo, el ADC Adcetris (TM) (brentuximab vedotin), que tiene monometil auristatina E conjugado con un anticuerpo anti-CD30 monoclonal, ha sido aprobado como fármaco terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes. El Kadcyla (TM) (trastuzumab emtansina), que tiene emtansina conjugada con un anticuerpo anti-HER2 monoclonal, se usa para el tratamiento de cánceres de mama avanzados y recurrentes positivos para HER2.

Un ejemplo útil de fármacos que pueden conjugarse con el ADC es la pirrolobenzodiazepina (PBD). La PBD exhibe citotoxicidad, por ejemplo, al unirse a la secuencia PuGPu en el surco menor del ADN. La antramicina, un PBD de origen natural, se descubrió por primera vez en 1965 y desde este descubrimiento se han descubierto varios PBD de origen natural y PBD analógicos de los mismos (literaturas no relacionadas con patente 1 a 4).

La fórmula estructural general de la PBD está representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]




Se conocen PBD que son diferentes en el número, tipo y sitio de sustituyentes en las partes del anillo A y C y PBD que son diferentes en grado de insaturación en las partes del anillo B y C.

Se sabe que las PBD tienen una citotoxicidad dramáticamente mejorada a través de la formación de una estructura de dímero (literaturas no relacionadas con patente 5, 6) y se han reportado varios ADC con una PBD de dímero (literatura de patente 1 a 13).

Sin embargo, no se conoce una PBD que tenga un anillo espiro en su posición C2 y una forma de ADC del mismo.

La CLDN6 humana (claudina-6, que se expresa en adelante como hCLDN6), un miembro de las proteínas de la familia de la claudina (CLDN), es una proteína de cuatro transmembranas que consta de 220 residuos de aminoácidos. Estudios previos han sugerido que la hCLDN6 se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer y es un objetivo terapéutico atractivo para el cáncer (literaturas no relacionadas con patente 7 a 9). Las proteínas de la familia de la CLDN se incorporan a las células por endocitosis, y se ha informado que algunas de las proteínas de la familia tienen un tiempo corto de renovación (literatura no relacionada con patente 10), y por lo tanto, las proteínas de la familia de la CLDN se consideran adecuadas como el objetivo de los fármacos inmunoconjugados (ADC).

A partir de dicha información que sugiere la relación con el cáncer, se han descubierto anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente la hCLDN6 (literaturas de patente 14, 15) y se ha informado ADC que tienen monometil auristatina E (MMAE) o maytansinoide (DM1), que son inhibidores de la polimerización de la tubulina, conjugados con un anticuerpo monoclonal específico para la CLDN6 (literatura no relacionada con patente 11).

Por otro lado, se considera que los anticuerpos capaces de reconocer múltiples miembros de la familia de la CLDN permiten un rango más amplio de aplicación del tratamiento y, en vista de ello, se ha divulgado (literatura de patente 17) un ADC que

tiene una pirrolobenzodiazepina (PBD) con un efecto potente de citocida conjugada con un anticuerpo capaz del reconocimiento de la CLDN6 y CLDN9 (literatura de patente 16).

Sin embargo, las intensidades de actividad de los ADC no son todavía suficientes y existen necesidades médicas que no se han suplido para el uso de la hCLDN6 como objetivo terapéutico.

Lista de referencias

Literatura de patente

[0003]

Literatura de patente 1: WO 2013/173496
Literatura de patente 2: WO 2014/130879
Literatura de patente 3: WO 2017/004330
Literatura de patente 4: WO 2017/004025
Literatura de patente 5: WO 2017/020972
Literatura de patente 6: WO 2016/036804
Literatura de patente 7: WO 2015/095124
Literatura de patente 8: WO 2015/052322
Literatura de patente 9: WO 2015/052534
Literatura de patente 10: WO 2016/115191
Literatura de patente 11: WO 2015/052321
Literatura de patente 12: WO 2015/031693
Literatura de patente 13: WO 2011/130613
Literatura de patente 14: WO 2009/087978
Literatura de patente 15: WO 2011/057788
Literatura de patente 16: WO 2015/069794
Literatura de patente 17: WO 2017/096163

Literatura no relacionada con patente

[0004]

Literatura no relacionada con patente 1: Julia Mantaj, et al., Angewandte Chemie Internationl Edition 2016, 55, 2-29
Literatura no relacionada con patente 2: Dyeison Antonow.et al., Chemical Reviews 2010, 111, 2815-2864

Literatura no relacionada con patente 3: In Antibiotics III. Springer Verlag, New York, páginas 3-11
Literatura no relacionada con patente 4: Accounts of Chemical Research 1986, 19, 230
Literatura no relacionada con patente 5: Journal of the American Chemical Society 1992,114, 4939
Literatura no relacionada con patente 6: Journal of Organic Chemistry 1996, 61, 8141
Literatura no relacionada con patente 7: BMC Cancer, 2006, 6, 186
Literatura no relacionada con patente 8: Histopatholody, 2012, 61, 1043-1056
Literatura no relacionada con patente 9: Int J Cancer, 2014, 135, 2206-2214
Literatura no relacionada con patente 10: J Membrane Biol, 2004, 199, 29-38
Literatura no relacionada con patente 11: 14th Annu Meet Cancer Immunother (CIMT) (May 10-12, Mainz) 2016, Abst 185

Resumen de la invención

Problemas a ser resueltos por la invención

[0005]

La presente invención proporciona un nuevo derivado de pirrolobenzodiazepina (PBD) inmunoconjugado y un nuevo derivado de pirrolobenzodiazepina (PBD).

La presente invención proporciona un nuevo anticuerpo anti-CLDN6.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el derivado de PBD inmunoconjugado, el derivado de PBD o el anticuerpo anti-CLDN6 con actividad antitumoral.

Además, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer usando el derivado de PBD, el derivado de PBD inmunoconjugado o el anticuerpo anti-CLDN6.

Medios para resolver los problemas

[0006]

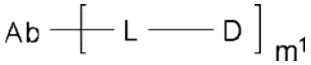
Los presentes inventores llevaron a cabo una examinación diligente para encontrar que un nuevo derivado de pirrolobenzodiazepina (PBD) inmunoconjugado tiene una fuerte actividad antitumoral, completando así la presente invención.

Específicamente, la presente invención hace referencia a lo siguiente.

[0007]

[1] Un fármaco inmunoconjugado representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]



en donde

$m^1$ representa un número entero de 1 a 10, preferiblemente un número entero de 2 a 8;

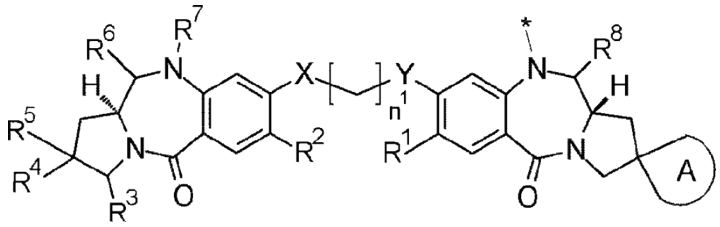
Ab representa un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, donde el anticuerpo tiene opcionalmente un glicano remodelado;

L representa un enlazador que une Ab y D;

Ab puede unirse directamente a través de su residuo de aminoácido a L o puede unirse a través de un glicano o un glicano remodelado de Ab a L; y

D representa un fármaco o representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 3]



en donde

el asterisco representa la unión a L;

$n^1$ representa un número entero de 2 a 8;

A representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros sustituido opcionalmente con uno a cuatro átomos de halógeno;

$R^1$ y $R^2$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi, un grupo tiol, un grupo alquiltio C1 a C6, un átomo de halógeno o -NR'R'', en donde R' y R'' representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6;

$R^3$, $R^4$ y $R^5$ se seleccionan de (i) a (iii):

(i) $R^3$ y $R^4$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^3$ y $R^4$ están unidos, para formar un doble enlace, y $R^5$ representa un grupo arilo o un grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 1 o un grupo alquilo C1 a C6 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 2,

(ii) $R^3$ representa un átomo de hidrógeno, y $R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, o $CH_2$=, y

(iii) $R^3$, $R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^3$ está unido y el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de benceno o un heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 3;

$R^6$ y $R^7$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, o $R^6$ y $R^7$ se combinan para representar un enlace imina (C=N);

$R^8$ representa un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3;

X e Y representan cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre;

el grupo 1 representa:

a) un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -NR'R'', -C(= NR')-NR''R''' y -NHC (=NR')-NR''R''',

c) un átomo de halógeno,

d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

e) un grupo alquiltio C1 a C6,

f) -NR'R'',

g) -C(=NR')-NR''R''',

h) -NHC(=NR')-NR''R''',

i) -NHCOR', o

j) un grupo hidroxi,

en donde R' y R'' son como se definieron anteriormente, y R''' representa cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6;

el grupo 2 representa un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C6; y

el grupo 3 representa un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1 a C6 o un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno.

[2] El fármaco inmunoconjugado según [1], en donde

A representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^1$ y $R^2$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

$R^3$ y $R^4$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^3$ y $R^4$ están unidos, para formar un doble enlace;

$R^5$ representa un grupo arilo o un grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 4 o un grupo alquilo C1 a C3 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 5;

X e Y son cada uno un átomo de oxígeno;

el grupo 4 representa:

a) un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR'', -C(=NR')-NR''R''' y -NHC(=NR')-NR''R''',

c) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

d) -C(=NR')-NR''R''',

e) -NHC(=NR')-NR''R''', o

f) un grupo hidroxi,

en donde R', R'' y R''' representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3; y

el grupo 5 representa un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3.

[3] El fármaco inmunoconjugado según [1], en donde

A representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^1$ y $R^2$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

$R^3$ representa un átomo de hidrógeno;

$R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros, o $=CH_2$; y

X e Y son cada uno un átomo de oxígeno.

[4] El fármaco inmunoconjugado según [1], en donde

A representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^1$ y $R^2$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

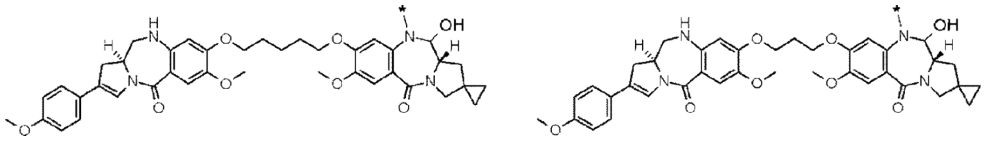
$R^3$, $R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^3$ está unido y el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de benceno que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 6;

X e Y son cada uno un átomo de oxígeno; y

el grupo 6 representa un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1 a C3 o un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno.

[5] El fármaco inmunoconjugado según [1] o [2], en donde D está representado por cualquiera de las dos fórmulas siguientes:

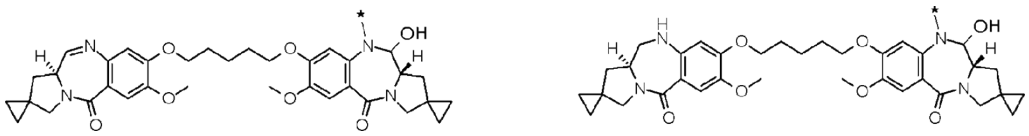
[Fórmula 4]



en donde cada asterisco representa la unión a L.

[6] El fármaco inmunoconjugado según [1] o [3], en donde D está representado por cualquiera de las dos fórmulas siguientes:

[Fórmula 5]



en donde cada asterisco representa la unión a L.

[7] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [6], en donde

L está representado por -Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*, el asterisco representa la unión a D;

B representa un grupo fenilo o un grupo heteroarilo;

Lp representa un enlazador que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible en una célula objetivo;

La representa a cualquiera seleccionado del grupo:

-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)n^2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)n^3$-C(=O)-,

-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)n^3$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)n^3$-$CH_2CH_2$-C(=O)- y -$(CH_2)n^4$- O-C(=O)-;

$n^2$ representa un número entero de 1 a 3, $n^3$ representa un número entero de 1 a 5 y $n^4$ representa un número entero de 0 a 2; y

Lb representa un separador que une La y un glicano o glicano remodelado de Ab.

[8] El fármaco inmunoconjugado según [7], en donde B es cualquiera seleccionado de un grupo 1,4-fenilo, un grupo 2,5-piridilo, un grupo 3,6-piridilo, un grupo 2,5-pirimidilo y un grupo 2,5-tienilo.

[9] El fármaco inmunoconjugado según [8], en donde B es un grupo 1,4-fenilo.

[10] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [9], en donde Lp son residuos de aminoácidos compuestos de dos a siete aminoácidos.

[11] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [10], en donde Lp son residuos de aminoácidos que consisten en aminoácidos seleccionados de glicina, valina, alanina, fenilalanina, ácido glutámico, isoleucina, prolina, citrulina, leucina, serina, lisina y ácido aspártico.

[12] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [11], en donde Lp se selecciona del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI- y -GGPL-.

[13] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [12], en donde La se selecciona del siguiente grupo:

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

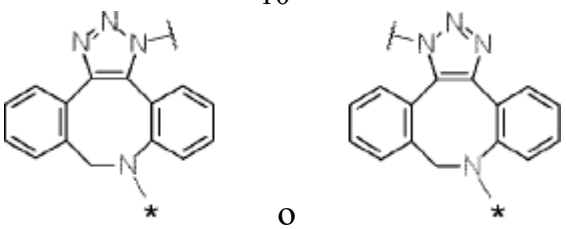
-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -$CH_2$-OC(=O)- y -OC(=O)-.

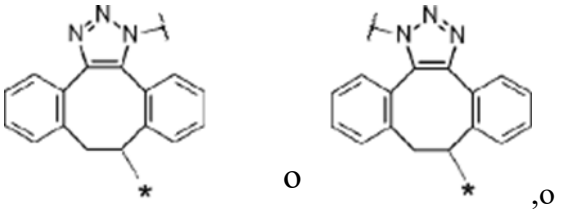
[14] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [13], en donde Lp está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 6]



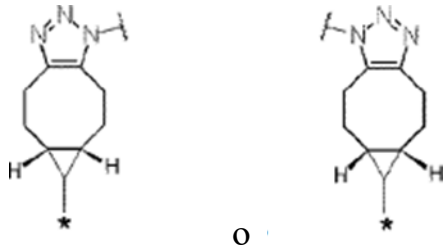
o

[Fórmula 7]



o ,o

[Fórmula 8]



o

en donde, en cada fórmula estructural para Lb que se muestra anteriormente,

cada asterisco representa la unión a La, y cada línea ondulada representa la unión a un glicano o glicano remodelado de Ab.

[15] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [14], en donde

L está representado por -Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*, en donde

B es un grupo 1,4-fenilo;

Lp representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK- y -GGPL-;

La representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

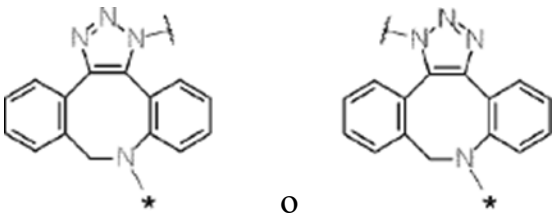
-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -$CH_2$-OC(=O)- y -OC(=O)-; y

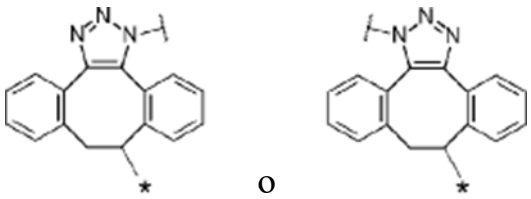
Lb está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 9]



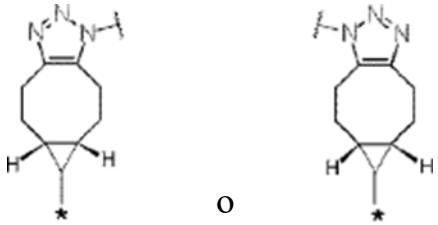
o

[Fórmula 10]



o , o

[Fórmula 11]



o

en donde, en cada fórmula estructural para Lb que se muestra anteriormente,

cada asterisco representa la unión a La, y cada línea ondulada representa la unión a un glicano o glicano remodelado de Ab.

[16] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [7] a [15], en donde

L se selecciona del siguiente grupo:

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPI-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVK-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPL-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

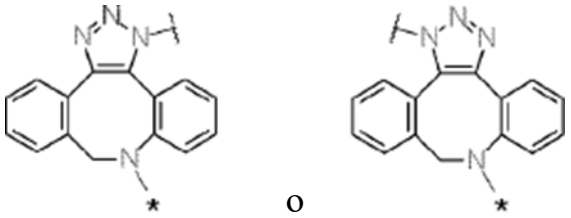
-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^2$-OC(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)- y -Z3-$CH_2$-OC(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, en donde

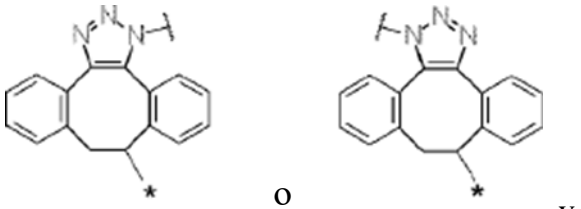
$Z^1$ representa la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 12]



$Z^2$ representa la siguiente fórmula estructural:

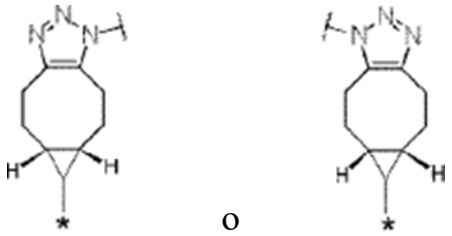
[Fórmula 13]



, y

Z3 representa la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 14]



en donde, en cada fórmula estructural para $Z^1$, $Z^2$ y $Z^3$,

cada asterisco representa la unión a La, cada línea ondulada representa la unión a un glicano o glicano remodelado de Ab; y

B representa un grupo 1,4-fenilo.

[17] El fármaco inmunoconjugado según [16], en donde

L se selecciona del siguiente grupo:

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

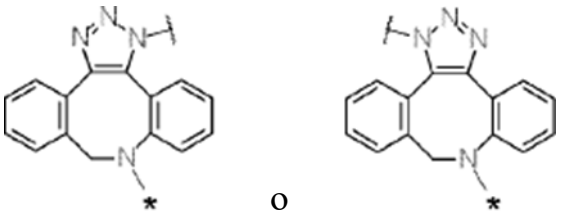
-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, y

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, en donde

B es un grupo 1,4-fenilo y $Z^1$ representa la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 15]



en donde, en la fórmula estructural para $Z^1$,

cada asterisco representa la unión a C(=O) adyacente a $Z^1$, y cada línea ondulada representa la unión a un glicano o glicano remodelado de Ab.

[18] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [6], en donde

L está representado por -Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*, en donde

el asterisco representa la unión a D;

B representa un grupo 1,4-fenilo;

Lp representa -GGVA- o -VA;

La representa -$(CH_2)n^9$-C(=O)- o -$(CH_2CH_2)n^{10}$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)n^{11}$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, en donde $n^9$ representa un número entero de 2 a 7, $n^{10}$ representa un número entero de 1 a 3 y $n^{11}$ representa un número entero de 6 a 10; y

Lb es -(succinimida-3-il-N)-.

[19] El fármaco inmunoconjugado según [18], en donde

L representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-(succinimida-3-il-N)-$(CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-(succinimida-3-il-N)-$(CH_2)_5$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, y

-(succinimida-3-il-N)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, en donde B es un grupo 1,4-fenilo.

[20] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [19], en donde el anticuerpo es IgG.

[21] El fármaco inmunoconjugado según [20], en donde el anticuerpo es IgG1, IgG2 o IgG4.

[22] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [21], en donde el anticuerpo se une a una célula tumoral y se incorpora e internaliza en la célula tumoral.

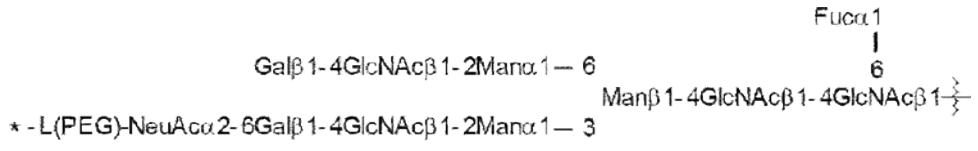
[23] El fármaco inmunoconjugado según [22], en donde el anticuerpo además tiene efecto antitumoral.

[24] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [17] y [20] a [23], en donde el anticuerpo se une a través de un enlace de glicano a Asn297 del anticuerpo (glicano N297) a L.

[25] El fármaco inmunoconjugado según [24], en donde el glicano N297 es un glicano remodelado.

[26] El fármaco inmunoconjugado según [24] o [25], en donde el glicano N297 es N297- (Fuc) MSG1, N297- (Fuc) MSG2, o una mezcla de los mismos, o N297- (Fuc) SG, en donde N297- (Fuc) MSG1, N297- (Fuc) MSG2 y N297- (Fuc) SG tienen estructuras representadas por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 16]




[N297-(Fuc)MSG1]

en donde

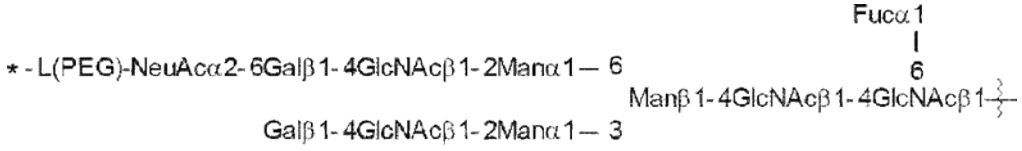
la línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo;

L(PEG) representa $-(CH_2CH_2-O)n^5-CH_2CH_2-NH-$, en donde el grupo amino en el extremo derecho está unido mediante un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-3 de β-Man en el glicano N297;

el asterisco representa la unión al enlazador L; y

$n^5$ representa un número entero de 2 a 10,

[Fórmula 17]




[N297-(Fuc)MSG2]

en donde

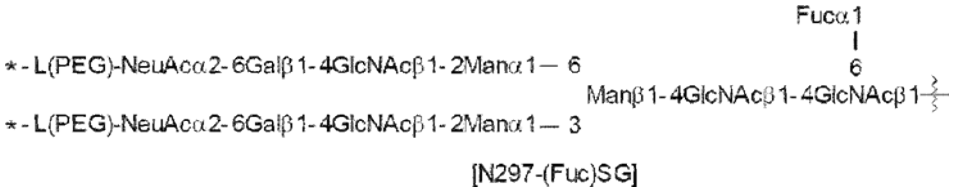
la línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo;

L(PEG) representa -($CH_2CH_2$-O)$n^5$-$CH_2CH_2$-NH-, en donde el grupo amino en el extremo derecho está unido mediante un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-6 de β-Man en el glicano N297;

el asterisco representa la unión al enlazador L; y

$n^5$ representa un número entero de 2 a 10, y

[Fórmula 18]




[N297-(Fuc)SG]

en donde

la línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo;

L(PEG) representa -($CH_2CH_2$-O)$n^5$-$CH_2CH_2$-NH-, en donde el grupo amino en el extremo derecho está unido mediante un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 de β-Man en el glicano N297;

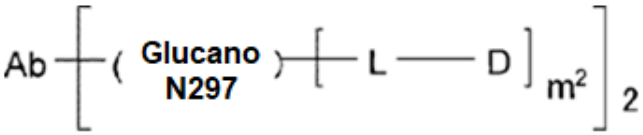
el asterisco representa la unión al enlazador L; y

$n^5$ representa un número entero de 2 a 10.

[27] El fármaco inmunoconjugado según [26], en donde n5 es un número entero de 2 a 5.

[28] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [24] a [27], representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 19]




en donde

$m^2$ representa un número entero de 1 o 2;

L es un enlazador que une el glicano N297 de Ab y D y es cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-GGVCit-NH-B-CH_2-OC(=O)-$,

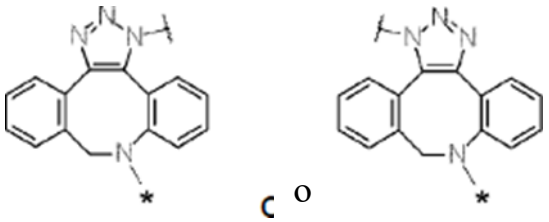
$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$,

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$, y

$-Z^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-VA-NH-B-CH_2-OC(=O)-$, en donde

B es un grupo 1,4-fenilo y $Z^1$ representa la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 20]



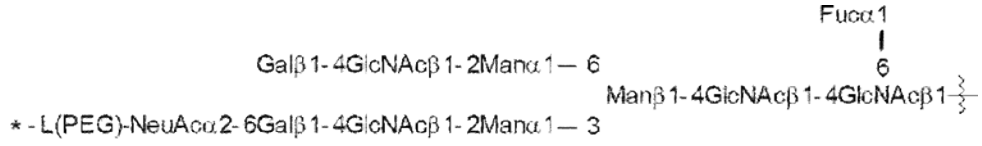
en donde, en la fórmula estructural para $Z^1$,

cada asterisco representa la unión a C(=O) adyacente a $Z^1$, y cada línea ondulada representa la unión a glicano N297 de Ab;

Ab representa un anticuerpo IgG o un fragmento funcional del anticuerpo;

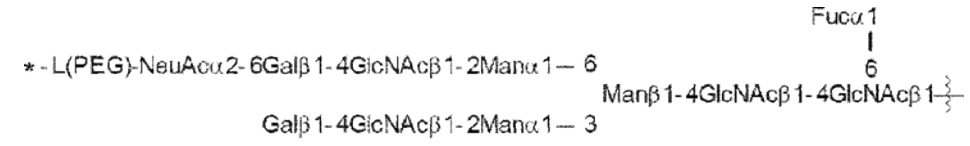
el glicano N297 de Ab representa a cualquiera de N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, y una mezcla de los mismos, y N297-(Fuc)SG, en donde N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 y N297-(Fuc)SG tienen estructuras representadas por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 21]



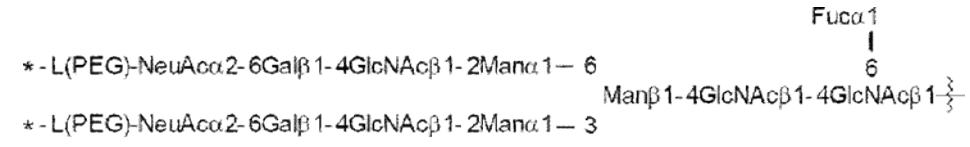

[N297-(Fuc)MSG1]

[Fórmula 22]




[N297-(Fuc)MSG2]

[Fórmula 23]




[N297-(Fuc)SG]

en donde

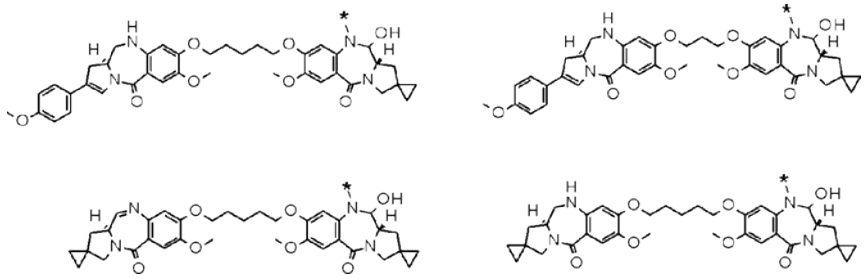
cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) en el glicano N297 representa -NH-$CH_2CH_2$-(O-$CH_2CH_2$)$n^5$-*, en donde

$n^5$ representa un número entero de 2 a 5, el grupo amino en el extremo izquierdo está unido a través de un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una o en una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 de β-Man en el glicano N297, y cada asterisco representa la unión a un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de triazol de $Z^1$ en el enlazador L; y

D es cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

[Fórmula 24]

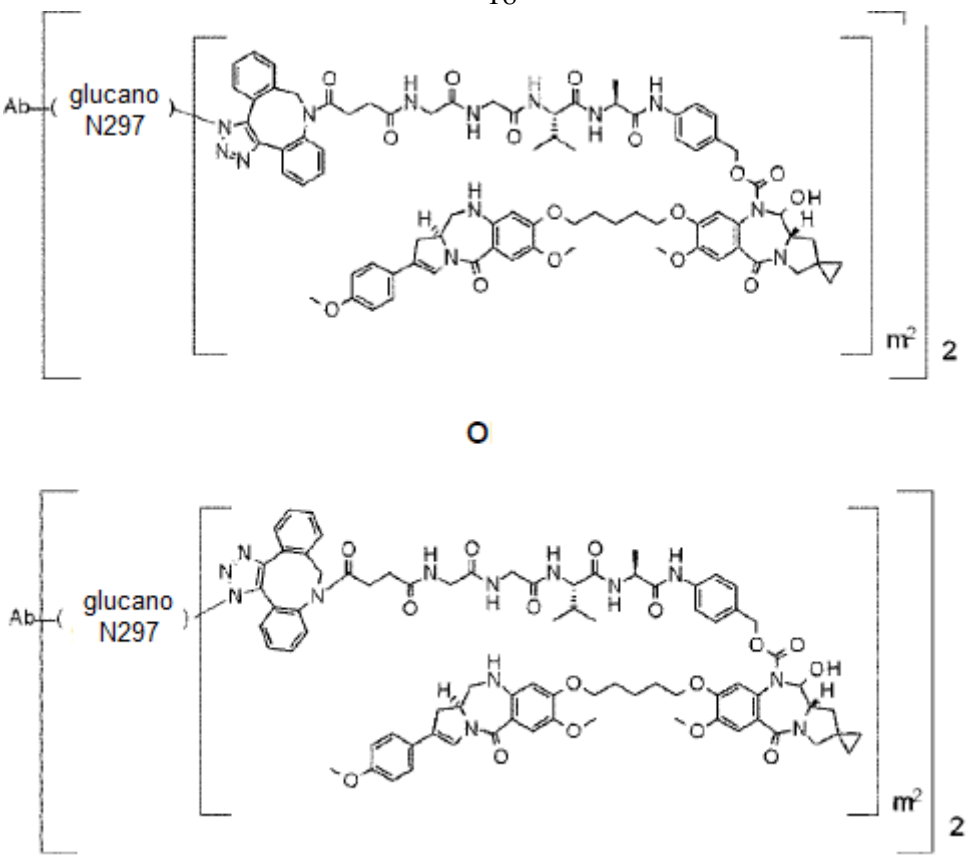


en donde

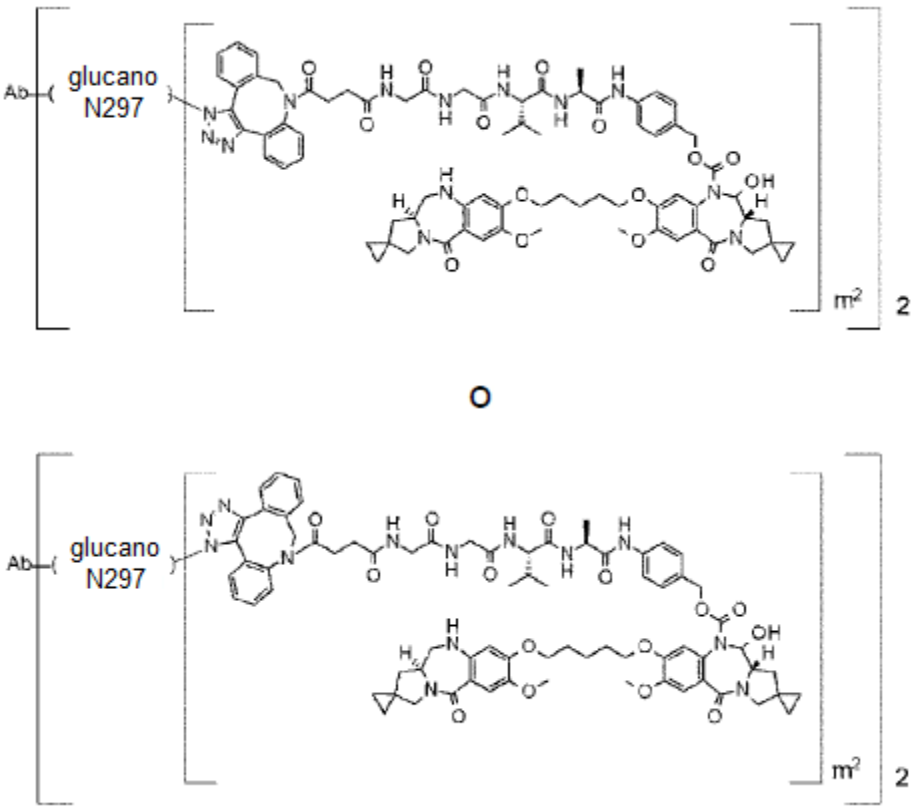
cada asterisco representa la unión a L.

[29] Un fármaco inmunoconjugado seleccionado del siguiente grupo:

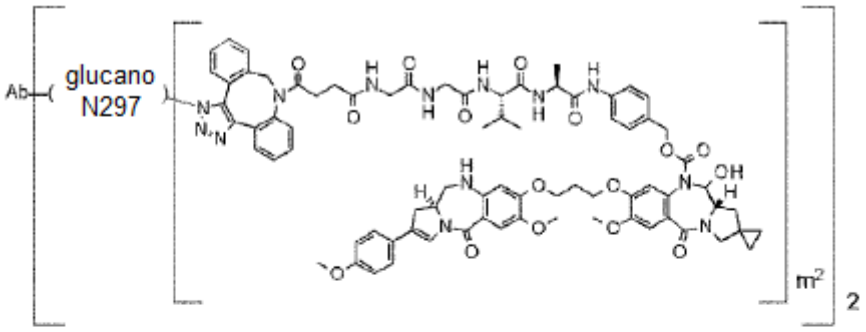
[Fórmula 25]


Ab
glucano
N297
m2
2
O
Ab
glucano
N297
m2
2

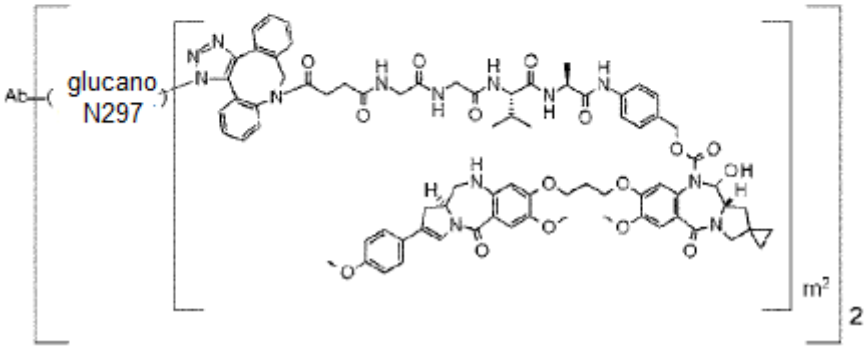
[Fórmula 26]


Ab
glucano
N297
m2
2
O
Ab
glucano
N297
m2
2

[Fórmula 27]

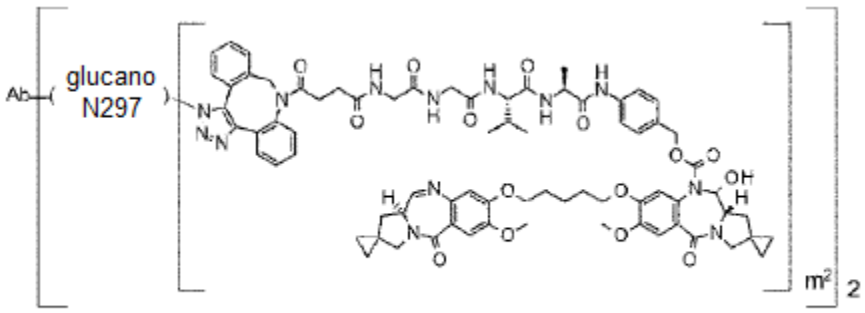



O

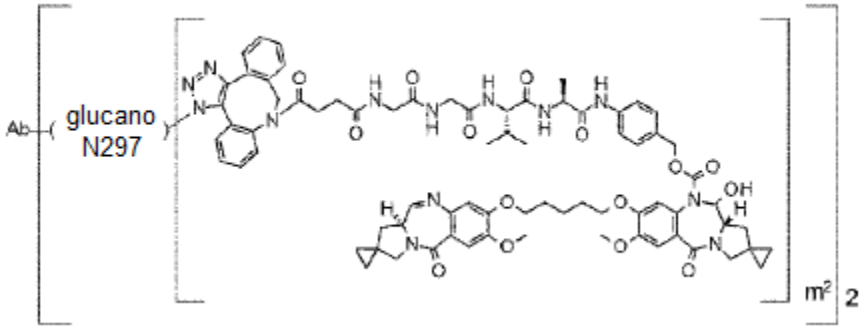



, o

[Fórmula 28]




O



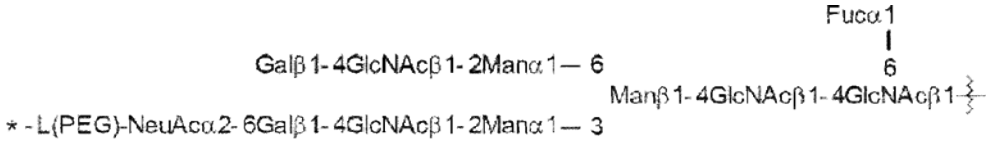

en donde, en cada fórmula estructural que se muestra anteriormente,

$m^2$ representa un número entero de 1 o 2;

Ab representa un anticuerpo IgG o un fragmento funcional del anticuerpo;

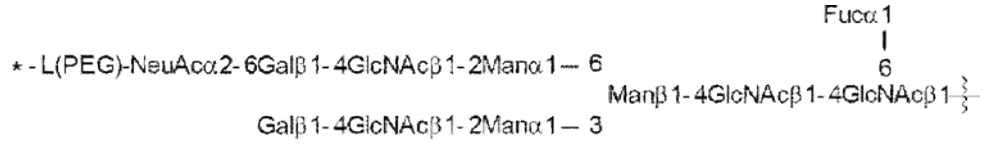
el glicano N297 de Ab representa a cualquiera de N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, y una mezcla de los mismos, y N297-(Fuc)SG, en donde N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 y N297-(Fuc)SG tienen estructuras representadas por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 29]



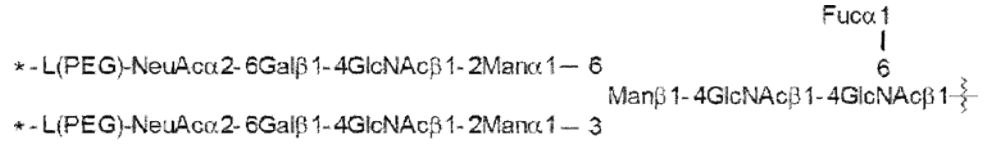

[N297-(Fuc)MSG1]

[Fórmula 30]




[N297-(Fuc)MSG2]

[Fórmula 31]




[N297-(Fuc)SG]

en donde

cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) en el glicano N297 representa -NH-$CH_2CH_2$- (O-$CH_2CH_2$)$_3$- *, en donde

el grupo amino en el extremo izquierdo está unido mediante un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una o en una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 de β-Man en el glicano N297, y cada asterisco representa la unión a un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de triazol en la fórmula estructural correspondiente.

[30] Un anticuerpo que se une a CLDN6 y/o CLDN9, o un fragmento funcional del anticuerpo.

[31] El anticuerpo según [30] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde CLDN6 es una molécula que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, y CLDN9 es una molécula que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3.

[32] El anticuerpo según [30] o [31] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una cadena liviana que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 como se describe en cualquiera de los siguientes (a) y (b):

(a) CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, y CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que tiene una o dos sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7; y

(b) CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17, y CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14.

[33] El anticuerpo según [32] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una cadena liviana que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 como se describe en cualquiera de los siguientes (a) y (b):

(a) CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, y CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8; y

(b) CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15, CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada

por la SEQ ID NO: 16, y CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17, y CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13, y CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14.

[34] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [33] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana como se describe en cualquiera de los siguientes (a) y (b):

(a) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19; y

(b) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23.

[35] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [34] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e) y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los siguientes (f) a (k):

(a) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54;

(b) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58;

(c) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62;

(d) una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos 95 % o más con una secuencia de una región marco que excluye secuencias de CDR en cualquiera de las secuencias (a) a (c);

(e) una secuencia de aminoácidos que tiene de una a varias deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en una secuencia de una región marco que excluye secuencias de CDR en cualquiera de las secuencias (a) a (c);

(f) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38;

(g) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42;

(h) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46;
(i) una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 50;
(j) una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos 95 % o más con una secuencia de una región marco que excluye secuencias de CDR en cualquiera de las secuencias (f) a (i); y
(k) una secuencia de aminoácidos que tiene de una a varias deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en una secuencia de una región marco que excluye secuencias de CDR en cualquiera de las secuencias (f) a (i).

[36] El anticuerpo según [35] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana como se describe en cualquiera de los siguientes (a) y (e):
(a) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38;

(b) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42;

(c) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46;

(d) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 50; y

(e) una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62 y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46.

[37] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [36] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

[38] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [36] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

[39] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [38] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana.

[40] El anticuerpo según [38] o [39] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena liviana seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e):

(a) una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 36 (H1L1);

(b) una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 40 (H2L2);

(c) una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44 (H1L3);

(d) una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 48 (H2L4); y

(e) una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 60 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44 (H3L3).

[41] El anticuerpo según [30] o [31] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a un sitio de un antígeno reconocible para el anticuerpo según cualquiera de [32] a [36] y [40].

[42] El anticuerpo según [30] o [31] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo compite con el anticuerpo según cualquiera de [32] a [36] y [40] para unirse a CLDN6 y/o CLDN9.

[43] Un polinucleótido que codifica el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42].

[44] El polinucleótido según [43], que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (j):

(a) un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 y un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38;

(b) un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 y un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42;

(c) un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 y un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46;

(d) un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 y un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 50;

(e) un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62 y un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46;

(f) un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 y un polinucleótido que codifica una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 36;

(g) un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 y un polinucleótido que codifica una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 40;

(h) un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 y un polinucleótido que codifica una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44;

(i) un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 y un polinucleótido que codifica una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 48; y

(j) un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 60 y un polinucleótido que codifica una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44.

[45] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según [43] o [44].

[46] Una célula huésped transformada con el vector de expresión según [45].

[47] La célula huésped según [46], en donde la célula huésped es una célula eucariota.

[48] La célula huésped según [47], en donde la célula huésped es una célula animal.

[49] Un método para producir el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42] o un fragmento funcional del anticuerpo, el método que comprende los pasos de: cultivar la célula huésped según cualquiera de [46] a [48]; y recolectar un anticuerpo objetivo del cultivo obtenido en la etapa de cultivo.

[50] Un anticuerpo obtenido mediante el uso del método según [49] o un fragmento funcional del anticuerpo.

[51] El anticuerpo según cualquiera de [30] a [42] y [50] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación unida a N, glicosilación unida a O, procesamiento del extremo N, procesamiento del extremo C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina en un extremo N, amidación de un residuo de prolina y deleción de uno o dos residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo de una cadena pesada.

[52] El anticuerpo según [51] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde uno o varios residuos de aminoácidos se eliminan en el extremo carboxilo de una cadena pesada.

[53] El anticuerpo según [52] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde un residuo de aminoácido se elimina en el extremo carboxilo de cada una de las dos cadenas pesadas.

[54] El anticuerpo según cualquiera de [50] a [53] o un fragmento funcional del anticuerpo, en donde un residuo de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada se amida adicionalmente.

[55] Un método para producir un anticuerpo remodelado con glicano, el método que comprende los pasos de:

i) cultivar la célula huésped según cualquiera de [46] a [48] y recolectar un anticuerpo objetivo del cultivo obtenido;

ii) tratar el anticuerpo obtenido en el paso i) con hidrolasa para producir un anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc; y

iii)-1 hacer reaccionar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc y una molécula donadora de glicano en presencia de transglicosidasa, la molécula donadora de glicano obtenida mediante la introducción de un enlazador PEG que tiene un grupo azida al grupo carbonilo de ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en MSG (9) o SG (10), y oxazolinizar el extremo reductor o

iii)-2 hacer reaccionar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc y una molécula donadora de glicano en presencia de transglucosidasa, la molécula donadora de glicano obtenida mediante la introducción de un enlazador PEG que tiene un grupo azida al grupo carbonilo de ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en (MSG-)Asn o (SG-)Asn con un grupo α-amino opcionalmente protegido y al grupo carbonilo de ácido carboxílico en Asn, provocando la acción de la hidrolasa, y luego oxazolinizar el extremo reductor.

[56] El método según [55], que comprende además el paso de purificar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc a través de la purificación de una solución de reacción en el paso ii) con una columna de hidroxiapatita.

[57] Un método para producir el fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [29], el método que comprende los pasos de:

i) producir un anticuerpo remodelado con glicano mediante el uso del método según [55] o [56]; y

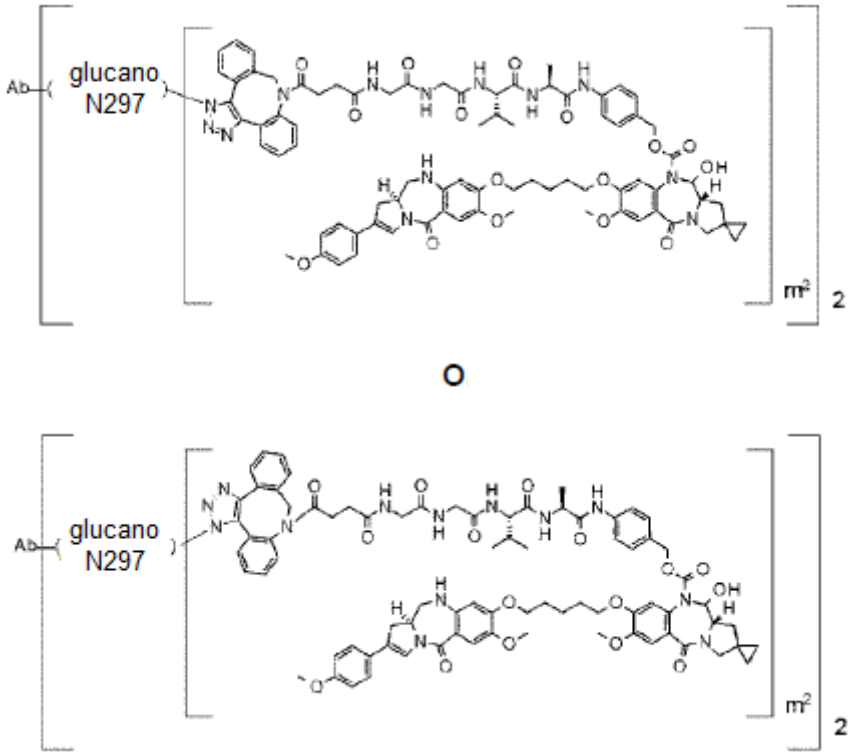
ii) hacer reaccionar un enlazador de fármaco que tiene DBCO (un intermedio de producción) y un grupo azida en un glicano del anticuerpo remodelado con glicano producido en el paso i).

[58] Un anticuerpo remodelado con glicano obtenido mediante el uso del método según [55] o [56].

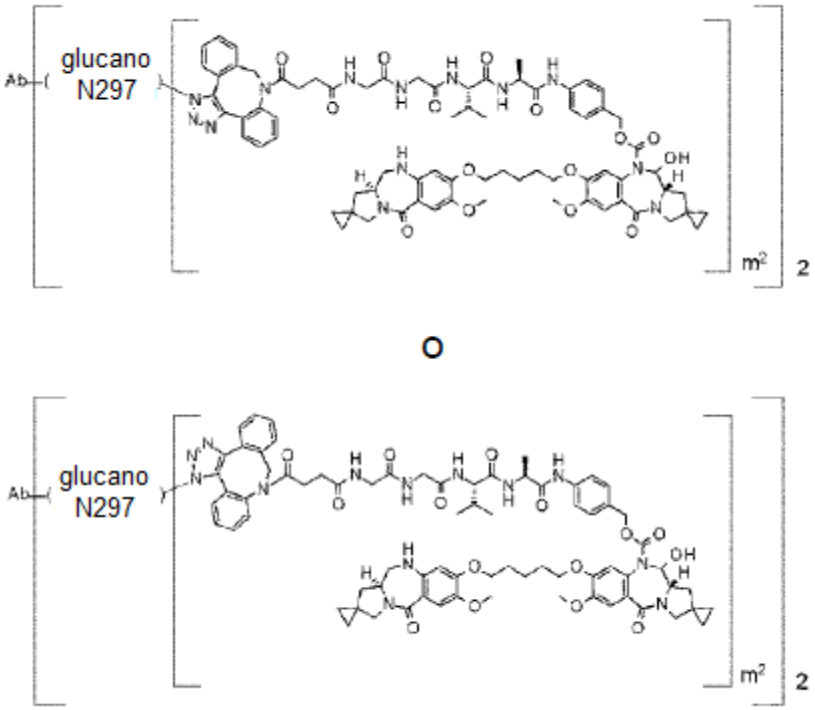
[59] Un fármaco inmunoconjugado obtenido mediante el uso del método según [57].

[60] Un fármaco inmunoconjugado seleccionado del siguiente grupo:

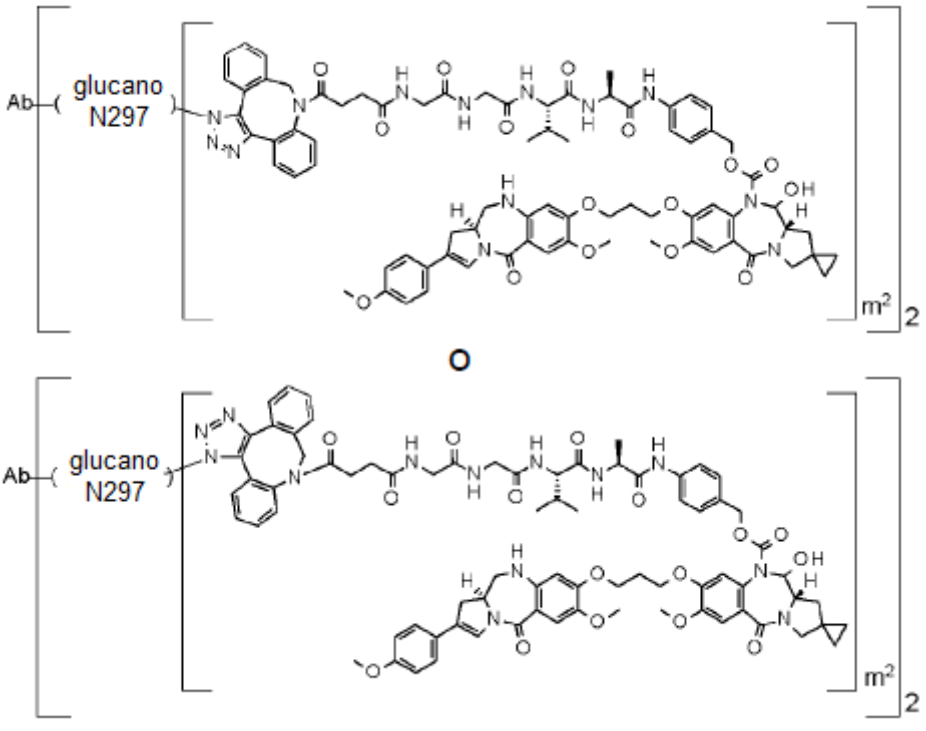
[Fórmula 32]




[Fórmula 33]

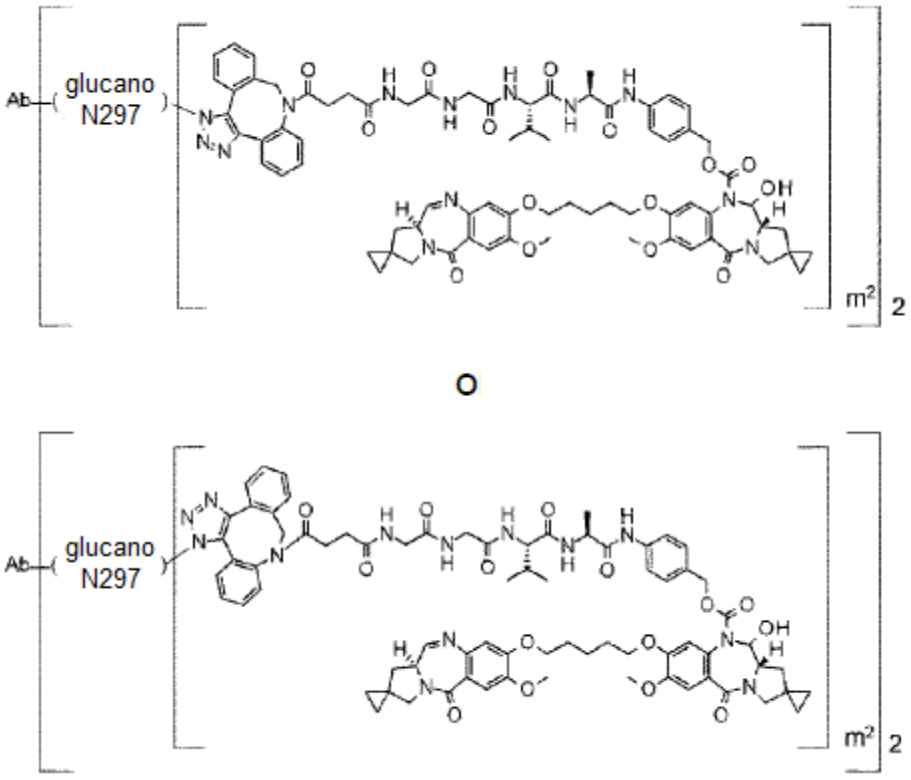



[Fórmula 34]




, o

[Fórmula 35]




en donde, en cada fórmula estructural que se muestra anteriormente,

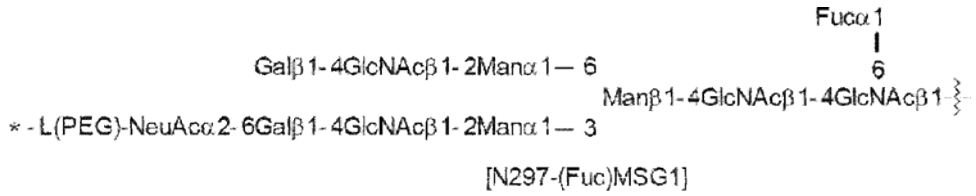
$m^2$ representa un número entero de 1 o 2;

Ab representa el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42], [50] a [54], y

[58] o un fragmento funcional del anticuerpo, o un anticuerpo anti-HER2; y

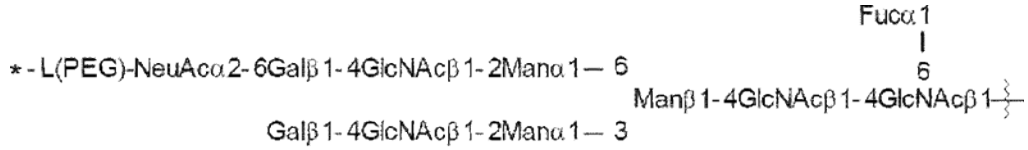
el glicano N297 de Ab representa a cualquiera de N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, y una mezcla de los mismos, y N297-(Fuc)SG, en donde N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 y N297-(Fuc)SG tienen estructuras representadas por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 36]



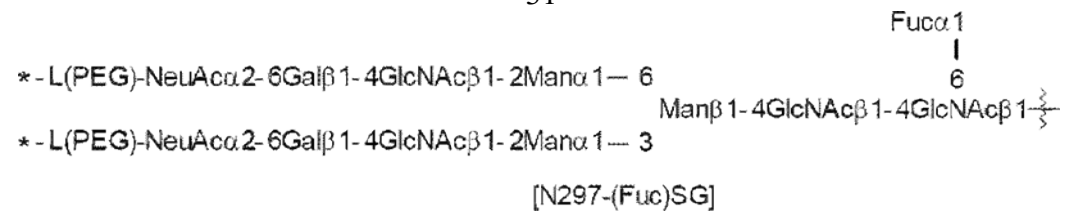

[N297-(Fuc)MSG1]

[Fórmula 37]




[N297-(Fuc)MSG2]

[Fórmula 38]




en donde

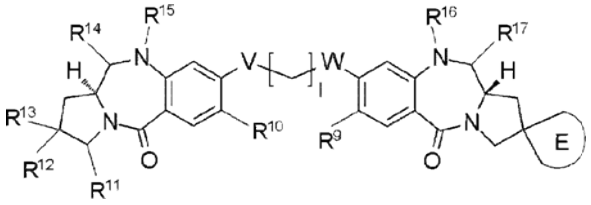
cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) representa -NH-$CH_2CH_2$-$(O-CH_2CH_2)^3$-*, en donde el grupo amino en el extremo izquierdo está unido mediante un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una o en una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 de β-Man en el glicano N297, y cada asterisco representa la unión a un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de triazol en la fórmula estructural correspondiente.

[61] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [29], [59] y [60], en donde el número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado es de 1 a 3 o 3 a 5.

[62] Un compuesto, una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal, el compuesto representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 39]




en donde

1 representa un número entero de 2 o 8;

E representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros sustituido opcionalmente con uno a cuatro átomos de halógeno;

$R^9$ y $R^{10}$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi, un grupo tiol, un grupo alquiltio C1 a C6, un átomo de halógeno o -NR'R'', en donde

R' y R'' representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6;

$R^{11}$, $R^{12}$ y $R^{13}$ se seleccionan de los siguientes (i) a (iii):

(i) $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace, y $R^{13}$ representa un grupo arilo o un grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 7 o un grupo alquilo C1 a C6 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 8,

(ii) $R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno, y $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, o $CH_2$=, y

(iii) $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan para formar un anillo de benceno o un heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 9, y $R^{13}$ representa un enlace único;

$R^{14}$ y $R^{15}$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, o $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para representar un enlace imina (C=N);

$R^{16}$ y $R^{17}$ representan cualquiera de los siguientes (a) y (b):

(a) $R^{16}$ y $R^{17}$ se combinan para formar un enlace imina (N=C), y

(b) $R^{16}$ representa J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O(C=O)-*,

en donde

el asterisco representa la unión al átomo de nitrógeno adyacente a $R^{16}$,

B' representa un grupo fenilo o un grupo heteroarilo,

Lp' representa un enlazador que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible en una célula objetivo,

La' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^6$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)n^6$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)n^7$-C(=O)-,

-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^6$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)n^7$-$CH_2$-C(=O)-,

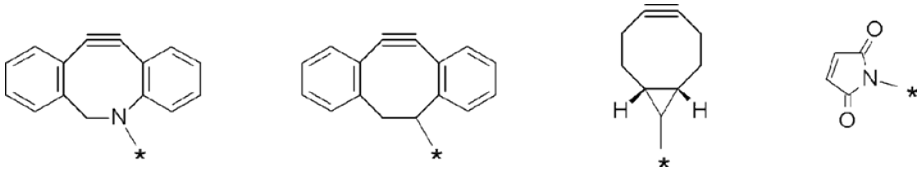
-C(=O)-$(CH_2CH_2)n^6$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)n^7$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -$(CH_2)n^8$-O-C(=O)-,

-$(CH_2)n^{12}$-C(=O)-, y -$(CH_2CH_2)n^{13}$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)n^{14}$-$CH_2CH_2$-C(=O)-,

en donde $n^6$ representa un número entero de 1 a 3, $n^7$ representa un número entero de 1 a 5, $n^8$ representa un número entero de 0 a 2, $n^{12}$ representa un número entero de 2 a 7, $n^{13}$ representa un número entero de 1 a 3, y $n^{14}$ representa un número entero de 6 a 10,

J representa a cualquiera de los siguientes:

[Fórmula 40]



en donde, en las fórmulas estructurales para J que se muestran anteriormente,

cada asterisco representa la unión a La';

$R^{17}$ representa un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3;

V y W son cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de azufre;

el grupo 7 representa:

a) un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -NR'R'', -C(=NR')-NR''R''' y -NHC (=NR')-NR''R''',

c) un átomo de halógeno,

d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

e) un grupo alquiltio C1 a C6,

f) -NR'R'',

g) -C(=NR')-NR''R''',

h) -NHC(=NR')-NR''R''',

i) -NHCOR', o

j) un grupo hidroxi,

en donde

R' y R'' son como se definieron anteriormente, y R''' representa cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6;

el grupo 8 representa un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C6; y

el grupo 9 representa un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1 a C6 o un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno.

[63] El compuesto según [62], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

E representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^9$ y $R^{10}$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

$R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace;

$R^{13}$ representa un grupo arilo o un grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 10 o un grupo alquilo C1 a C3 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 11;

V y W son cada uno un átomo de oxígeno;

el grupo 10 representa:

a) un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR'', -C(=NR')-NR''R''' y -NHC (=NR')-NR''R''',

c) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

d) -C(=NR')-NR''R''',

e) -NHC(=NR')-NR''R''', o

f) un grupo hidroxi,

en donde

R', R'' y R''' representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3; y

el grupo 11 representa un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3.

[64] El compuesto según [62], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

E representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^9$ y $R^{10}$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

$R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno;

$R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^{12}$ y $R^{13}$ están unidos, para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros, o $=CH_2$; y

V y W son cada uno un átomo de oxígeno.

[65] El compuesto según [62], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

E representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro sustituido opcionalmente con uno o dos átomos de halógeno;

$R^9$ y $R^{10}$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C3;

$R^{11}$, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^{11}$ está unido y el átomo de carbono al que $R^{12}$ y $R^{13}$ están unidos, para formar un anillo de benceno que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 12;

V y W son cada uno un átomo de oxígeno; y

el grupo 12 representa un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1 a C3 o un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno.

[66] El compuesto según cualquiera de [62] a [65], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

B' es cualquiera seleccionado de un grupo 1,4-fenilo, un grupo 2,5-piridilo, un grupo 3,6-piridilo, un grupo 2,5-pirimidilo y un grupo 2,5-tienilo.

[67] El compuesto según [66], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde B' es un grupo 1,4-fenilo.

[68] El compuesto según cualquiera de [62] a [67], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde Lp' son residuos de aminoácidos seleccionados del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)P-I- y -GGPL-.

[69] El compuesto según cualquiera de [62] a [68], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde La' se selecciona del siguiente grupo:

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-CH_2-OC(=O)-$, $-OC(=O)-$,

$-(CH_2)_5-C(=O)-$ y $-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)-$.

[70] El compuesto según cualquiera de [62] a [69], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

$R^{16}$ está representado por J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O(C=O)-*, en donde

B' es un grupo 1,4-fenilo;

Lp' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK- y -GGPL-;

La' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

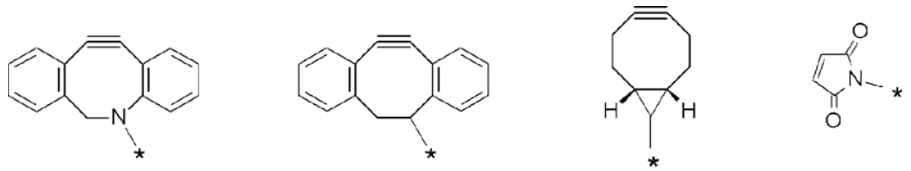
$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-CH_2-OC(=O)-$, $-OC(=O)-$,

$-(CH_2)_5-C(=O)-$ y $-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_8-CH_2CH_2-C(=O)$; y

J representa a cualquiera de los siguientes:

[Fórmula 41]



en donde, en la fórmula estructural para J,

cada asterisco representa la unión a La'.

[71] El compuesto según cualquiera de [62] a [70], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

$R^{16}$ se selecciona del siguiente grupo:

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGVA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GG-(D-)VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)$-VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGPI-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGFG-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGVCit-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGVK-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)$-GGPL-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)$-VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)$-VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^1-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)$-VA-NH-B'-$CH_2-OC(=O)-$,

$J^2$-OC(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

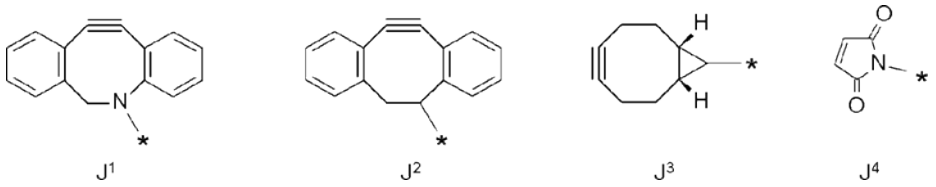
$J^3$-$CH_2$-OC(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, y $J^4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, en donde

$J^1$, $J^2$, $J^3$ y $J^4$ representan la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 42]




en donde, en las fórmulas estructurales para $J^1$, $J^2$, $J^3$ y $J^4$, cada asterisco representa la unión a un grupo adyacente, y

B' es un grupo 1,4-fenilo.

[74] El compuesto según cualquiera de [62] a [71], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, en donde

$R^{16}$ se selecciona del siguiente grupo:

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

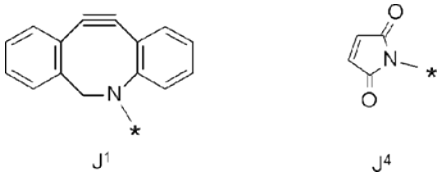
$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, y

$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, en donde

B' es un grupo 1,4-fenilo, y

$J^1$ y $J^4$ representan la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 43]

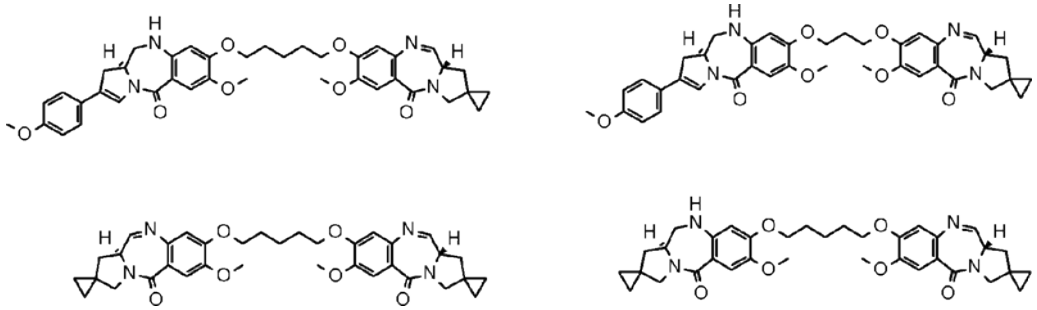



en donde, en las fórmulas estructurales para $J^1$ y $J^4$,

cada asterisco representa la unión a un grupo adyacente.

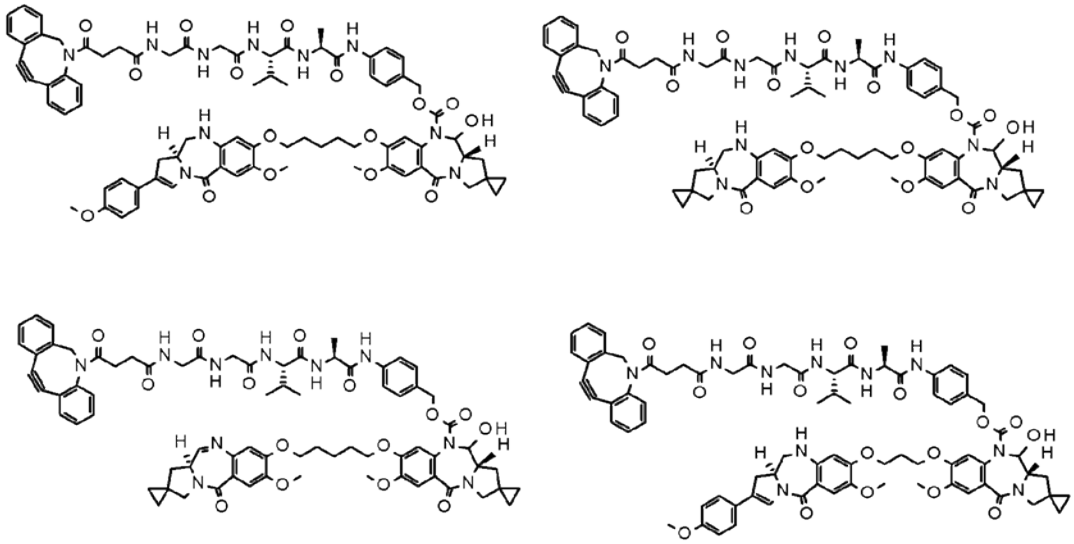
[73] Un compuesto, una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal, en donde el compuesto es cualquier compuesto seleccionado de las siguientes fórmulas:

[Fórmula 44]



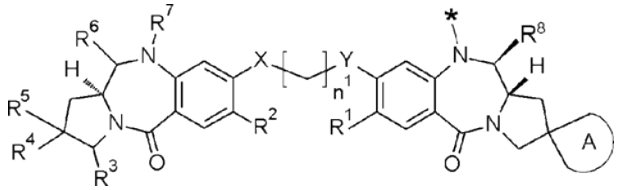
[74] Un compuesto, una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal, en donde el compuesto es cualquier compuesto seleccionado de las siguientes fórmulas:

[Fórmula 45]



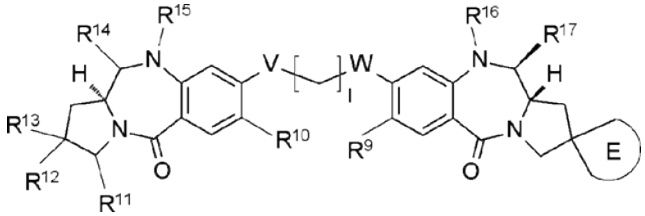
[75] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [29] y [59] a [61], en donde D está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 46]



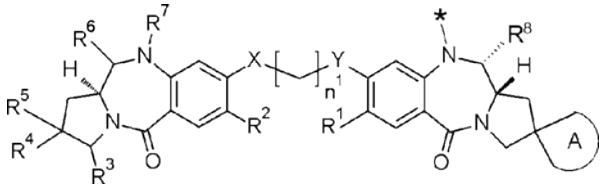
[76] El compuesto según cualquiera de [62] a [72] y [74], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, el compuesto representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 47]



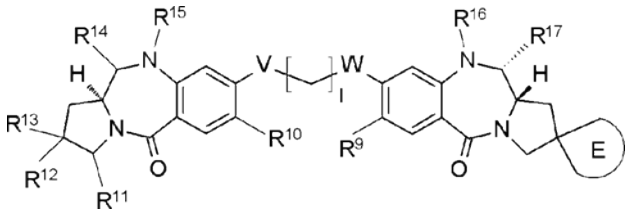
[77] El fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [29] y [59] a [61], en donde D está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 48]



[78] El compuesto según cualquiera de [62] a [72] y [74], una sal del compuesto, o un hidrato del compuesto o la sal, el compuesto representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 49]



[79] Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los fármacos inmunoconjugados según cualquiera de [1] a [29] y [59] a [61], [75] y [77], una sal del fármaco inmunoconjugado o un hidrato del fármaco inmunoconjugado o la sal; el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42], [50] a [54] y [58] o un fragmento funcional del anticuerpo; y el compuesto según cualquiera de [62] a [74], [76] y [78], una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal.

[80] La composición farmacéutica según [79], es un fármaco antitumoral.

[81] La composición farmacéutica según [80], en donde el tumor es un tumor que expresa CLDN6 y/o CLDN9.

[82] La composición farmacéutica según [80] u [81], en donde el tumor es cáncer de ovario (tumor epitelial, tumor del estroma o tumor de células germinales), cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer testicular (seminoma o no seminoma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, tumor cerebral, cáncer pancreático, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer de esófago.

[83] Un método para tratar un tumor, en donde cualquiera de los fármacos inmunoconjugados según cualquiera de [1] a [29] y [59] a [61], [75] y [77], una sal del fármaco inmunoconjugado o un hidrato del fármaco inmunoconjugado o la sal; el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42], [50] a [54] y [58] o un fragmento funcional del anticuerpo; y el compuesto según cualquiera de [62] a [74], [76] y [78], una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal se administran a un individuo.

[84] El método según [83], en donde el tumor es un tumor que expresa CLDN6 y/o CLDN9.

[85] El método según [83] u [84], en donde el tumor es cáncer de ovario (tumor epitelial, tumor del estroma o tumor de células germinales), cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer testicular (seminoma o no seminoma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, tumor cerebral, cáncer pancreático, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer de esófago.

[86] Un método para tratar un tumor, en donde una composición farmacéutica que comprende al menos uno seleccionado del fármaco inmunoconjugado según cualquiera de [1] a [29] y [59] a [61], [75] y [77], una sal del fármaco inmunoconjugado o un hidrato del fármaco inmunoconjugado o la sal; el anticuerpo según cualquiera de [30] a [42], [50] a [54] y [58] o un fragmento funcional del anticuerpo; y el compuesto según cualquiera de [62] a [74], [76] y [78], una sal del compuesto o un hidrato del compuesto o la sal, y al menos un fármaco antitumoral se administran a un individuo de manera simultánea, por separado o de manera consecutiva.

[87] Un compuesto que exhibe RMN de protón que tiene posiciones máximas sustancialmente similares a las posiciones máximas enumeradas en la Tabla 1 o la Tabla 2.

## Efectos ventajosos de la invención

[0008]

El nuevo derivado de pirrolobenzodiazepina (PBD) inmunoconjugado proporcionado por la presente invención es superior en actividad antitumoral y seguridad y, por lo tanto, útil como agente antitumoral. El derivado de PBD de la presente invención tiene actividad antitumoral y es útil por lo tanto como fármaco para el conjugado. Además, el anticuerpo de la presente invención reconoce las células tumorales o se une a las células tumorales y es útil por lo tanto como anticuerpo para el conjugado.

## Breve descripción de los dibujos

[0009]

[Figura 1] La Figura 1 es un diagrama esquemático del fármaco conjugado de la presente invención (la molécula de (I)). (a) indica el fármaco D, (b) indica el enlazador L, (c) indica $N_3$-L(PEG)- y (d) indica glicano N297 (elipse abierta: NeuAc(Sia), hexágono abierto: Man, hexágono lleno: GlcNAc, diamante abierto: Gal, triángulo invertido abierto: Fuc). (b) y (c) se combinan para formar un anillo de triazol por reacción entre el grupo azida (forma de lágrima llena) de (c) y el separador (semicírculo abierto) de (b). El diagrama en forma de Y

representa el anticuerpo Ab. Por conveniencia, en este diagrama esquemático, el glicano N297 se indica como N297-(Fuc)MSG y el diagrama muestra una realización en donde cualquiera de las dos ramas en cada uno de los glicanos N297 tiene un ácido siálico al que un enlazador PEG que tiene un grupo azida (N3-L(PEG)-) se une mientras que otra rama no tiene ácido siálico en el extremo no reductor (es decir, N297-(Fuc)MSG); sin embargo, también se acepta otra realización en donde cada una de las dos ramas de glicano N297 tiene un ácido siálico al que un enlazador PEG que tiene un grupo azida se une en el extremo no reductor (es decir, N297-(Fuc)SG). A menos que se indique lo contrario, dicha forma de ilustración se aplica a lo largo de la presente descripción.

[Figura 2] La Figura 2 son diagramas esquemáticos que ilustran las estructuras de un anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc (la molécula de A en (II) de la Figura 2), que es un intermedio de producción del fármaco conjugado de la presente invención y un anticuerpo remodelado con glicano de tipo MSG (la molécula de (III) en B de la Figura 2). En cada uno de los diagramas, el diagrama en forma de Y representa el anticuerpo Ab como en la Figura 1. En A en la Figura 2, (e) indica glicano N297 que consiste solo en GlcNAc en el posición 6 conectado a las posiciones 1 de Fuc a través de un enlace α-glucosídico. En B en la Figura 2, (d) indica el mismo glicano N297 que en la Figura 1 y (f) indica una estructura de una porción del enlazador PEG que tiene un grupo azida, específicamente, un grupo azida que se unirá al enlazador L en el extremo. El modo de enlace del enlazador PEG que tiene un grupo azida es como se describe para la Figura 1.

[Figura 3] La Figura 3 es un diagrama esquemático para el paso para producir un anticuerpo remodelado con glicano de tipo MSG a partir de un anticuerpo producido en una célula animal.Como en la Figura 2, las moléculas (II) y (III) en esta Figura representan un anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc y un anticuerpo remodelado con glicano de tipo MSG, respectivamente. La molécula (IV) es un anticuerpo producido en una célula animal y es una mezcla de moléculas con fracciones heterogéneas de glicano N297. La Figura 3A ilustra el paso para producir un anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc homogéneo (II) mediante el tratamiento de fracciones heterogéneas de glicano N297 de con hidrolasa como EndoS. La Figura 3B ilustra el paso para producir el anticuerpo remodelado con glicano de tipo MSG de (III) sometiendo GlcNAc de glicano N297 en el anticuerpo (II) a transglucosidasa tal como una variante EndoS D233Q/Q303L para transglucosilar el glicano de una molécula donante de glicano de tipo MSG. La molécula donante de glicano de tipo MSG utilizada aquí tiene un ácido siálico en el extremo no reductor de MSG modificado con un enlazador PEG que tiene un grupo azida. Por lo tanto, el anticuerpo remodelado con glicano N297 de tipo MSG resultante también tiene un ácido siálico en el extremo no reductor modificado de la misma manera que se describe para la Figura 2B. Por conveniencia, la Figura 3B muestra MSG como una molécula donante. Sin embargo, un anticuerpo remodelado con glicano en

el que una molécula enlazadora que tiene un grupo azida se une a cada extremo no reductor de glicano N297 también puede sintetizarse como el anticuerpo remodelado de (III) al utilizar SG(10) como donante de glicano.

[Figura 4] La Figura 4 muestra los efectos de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 ADC26, ADC19 y ADC54 en células NCI-N87 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer gástrico.

[Figura 5] La Figura 5 muestra los efectos del fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49, el trastuzumab y el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 en células NCI-N87 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer gástrico.

[Figura 6] La Figura 6 muestra los efectos del fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49, el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 y la trastuzumab-tesirina (ejemplo de referencia 1) en células KPL-4 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de mama. [Figura 7] La Figura 7 muestra el efecto del fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 y la trastuzumab-tesirina (ejemplo de referencia 1) en células JIMT-1 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de mama.

[Figura 8] La Figura 8 muestra los efectos del fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 y un anticuerpo anti-CLDN6 (H1L1)-tesirina (ejemplo de referencia 1) en células OV-90 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de ovario.

[Figura 9] La Figura 9 muestra los efectos del fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 y un anticuerpo anti-CLDN6(H1L1)-tesirina (ejemplo de referencia 1) en células NIH:OVCAR-3 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de ovario. [Figura 10] La Figura 10 muestra los efectos del fármaco inmunoconjugado anti-TROP2 ADC50 y el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 en células FaDu trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de cabeza y cuello.

[Figura 11] La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de CLDN6 humana (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa para CLDN6 humana (SEQ ID NO: 2).

[Figura 12] La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de CLDN9 humana (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de nucleótidos de ADNc de longitud completa para CLDN9 humana (SEQ ID NO: 4).

[Figura 13] La Figura 13 muestra las secuencias de aminoácidos de CDRL1 a 3 de una cadena liviana del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 5 a 7).

[Figura 14] La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de la cadena liviana del anticuerpo B1 humanizado L4 (SEQ ID NO: 8).

[Figura 15] La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de CDRH1 a 3 de una cadena pesada del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 9 a 11).

[Figura 16] La Figura 16 muestra las secuencias de aminoácidos de CDRL1 a 3 de una cadena liviana del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 12 a 14).
[Figura 17] La Figura 17 muestra las secuencias de aminoácidos de CDRH1 a 3 de una cadena pesada del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 15 a 17).
[Figura 18] La Figura 18 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de una cadena liviana del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 18) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena liviana del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 19). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 19] La Figura 19 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de una cadena pesada del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 20) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena pesada del anticuerpo B1 (SEQ ID NO: 21). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 20] La Figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de una cadena liviana del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 22) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena liviana del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 23). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 21] La Figura 21 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de una cadena pesada del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 24) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena pesada del anticuerpo C7 (SEQ ID NO: 25). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 22] La Figura 22 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena liviana del chB1 (SEQ ID NO: 28) y un fragmento de ADN que incluye una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena liviana del chB1 (SEQ ID NO: 29). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 23] La Figura 23 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena liviana del chB1 (SEQ ID NO: 30) y la secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena liviana del chB1 (SEQ ID NO: 31). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 24] La Figura 24 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada del chB1 (SEQ ID NO: 32) y la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada del chB1 (SEQ ID NO: 33). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 25] La Figura 25 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de una cadena pesada del chB1 (SEQ ID NO: 34) y la secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada del chB1 (SEQ ID NO: 35). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 26] La Figura 26 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL1 (SEQ ID NO: 36) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL1 (SEQ ID NO: 37). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 27] La Figura 27 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL1 (SEQ ID NO: 38) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL1 (SEQ ID NO: 39). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 28] La Figura 28 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL2 (SEQ ID NO: 40) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL2 (SEQ ID NO: 41). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 29] La Figura 29 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL2 (SEQ ID NO: 42) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL2 (SEQ ID NO: 43).
[Figura 30] La Figura 30 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3 (SEQ ID NO: 44) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3 (SEQ ID NO: 45). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 31] La Figura 31 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3 (SEQ ID NO: 46) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3 (SEQ ID NO: 47). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 32] La Figura 32 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL4 (SEQ ID NO: 48) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL4 (SEQ ID NO: 49). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 33] La Figura 33 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL4 (SEQ ID NO: 50) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL4 (SEQ ID NO: 51). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.
[Figura 34] La Figura 34 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH1 (SEQ ID NO: 52) y la secuencia de nucleótidos que codifica la

cadena pesada del anticuerpo humanizado hH1 (SEQ ID NO: 53). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 35] La Figura 35 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH1 (SEQ ID NO: 54) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH1 (SEQ ID NO: 55). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 36] La Figura 36 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH2 (SEQ ID NO: 56) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH2 (SEQ ID NO: 57). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 37] La Figura 37 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH2 (SEQ ID NO: 58) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH2 (SEQ ID NO: 59).

[Figura 38] La Figura 38 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH3 (SEQ ID NO: 60) y la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH3 (SEQ ID NO: 61). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 39] La Figura 39 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH3 (SEQ ID NO: 62) y la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado hH3 (SEQ ID NO: 63). Cada subrayado en la secuencia de aminoácidos indica una secuencia de CDR.

[Figura 40] La Figura 40 muestra las capacidades de unión de un anticuerpo B1 y un anticuerpo C7 al CLDN6 humana y las moléculas de la familia de la CLDN3, CLDN4 y CLDN9 medidas por citometría de flujo.

[Figura 41] La Figura 41 muestra las actividades de internalización del anticuerpo de un anticuerpo B1 y un anticuerpo C7 medidos por Mab-ZAP.

[Figura 42] La Figura 42 muestra las capacidades de unión de los anticuerpos humanizados anti-CLDN6 H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3 a CLDN6 y las moléculas de la familia medidas por citometría de flujo.

[Figura 43] La Figura 43 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del trastuzumab (SEQ ID NO: 64) y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del trastuzumab (SEQ ID NO: 65).

[Figura 44] La Figura 44 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena liviana de una variante del trastuzumab (SEQ ID NO: 73) y la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de una variante del trastuzumab (SEQ ID NO: 75).
[Figura 45] La Figura 45 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de chB1_H, que es una cadena pesada del anticuerpo anti-CLDN6 humano quimerizado chB1 y las cadenas pesadas del anticuerpo humanizado hH1, hH2 y hH3. El símbolo "." indica un residuo de aminoácido idéntico al residuo de aminoácido correspondiente de chB1_H y cada posición con un símbolo de un residuo de aminoácido indica un residuo de aminoácido sustituido.
[Figura 46] La Figura 46 muestra la comparación de las secuencias de aminoácidos de chB1_L, que es una cadena liviana del anticuerpo anti-CLDN6 humano quimerizado chB1 y las cadenas livianas del anticuerpo humanizado hL1, hL2, hL3 y hL4. El símbolo "." indica un residuo de aminoácido idéntico al residuo de aminoácido correspondiente de chB1_L y cada posición con el símbolo de un residuo de aminoácido indica un residuo de aminoácido sustituido.
[Figura 47] La Figura 47 muestra los efectos de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 ADC49 y ADC55 en células KPL-4 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de mama.
[Figura 48] La Figura 48 muestra el efecto del fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC55 en células JIMT-1 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de mama. [Figura 49] La Figura 49 muestra los efectos de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 ADC49 y ADC55, y el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 en las células CFPAC-1 trasplantadas subcutáneamente, una línea celular humana de cáncer de páncreas.

Descripción de realizaciones
[0010]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención es un fármaco antitumoral que tiene un compuesto antitumoral conjugado a través de una fracción de estructura enlazadora a un anticuerpo capaz de reconocer o unirse a células tumorales.
[0011]

En la presente invención, ejemplos del "átomo de halógeno" pueden incluir, entre otros, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo.
[0012]

En la presente invención, "grupo alquilo C1 a C6" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Ejemplos del "grupo alquilo C1 a C6" pueden incluir, entre otros, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo,

un grupo i-propilo, un grupo n-butilo, un grupo i-butilo, un grupo s-butilo, un t-butilo, un grupo n-pentilo y un n-hexilo.

[0013]

En la presente invención, “grupo alcoxi C1 a C6” se refiere a un grupo alcoxi que tiene un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Ejemplos del “grupo alcoxi C1 a C6” pueden incluir, entre otros, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propoxi, un grupo i-propoxi, un grupo n-butoxi, un i-butoxi, un grupo s-butoxi, un grupo n-pentiloxi y un n-hexiloxi.

[0014]

En la presente invención, “grupo alquiltio C1 a C6” se refiere a un grupo alquiltio que tiene un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Ejemplos del “grupo alquiltio C1 a C6” pueden incluir, entre otros, un grupo metiltio, un grupo etiltio, un grupo n-propiltio, un grupo i-propiltio, un grupo n-butiltio, un grupo i-butiltio, un grupo s-butiltio, un grupo t-butiltio, un grupo n-pentiltio y un grupo n-hexiltio.

[0015]

En la presente invención, “anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros” se refiere a un grupo de hidrocarburo cíclico saturado que tiene de tres a cinco átomos de carbono. Ejemplos del “anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros” pueden incluir, entre otros, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo y un grupo ciclopentilo.

[0016]

En la presente invención, “grupo cicloalcoxi C3 a C5” se refiere a un grupo cicloalcoxi que tiene un grupo de hidrocarburo cíclico saturado que tiene de tres a cinco átomos de carbono. Ejemplos del “grupo cicloalcoxi C3 a C5” pueden incluir, entre otros, un grupo ciclopropoxi, un grupo ciclobutoxi y un grupo ciclopentiloxi.

[0017]

En la presente invención, ejemplos del “heterociclo saturado de tres a cinco miembros” pueden incluir, entre otros, óxido de 1,3-propileno, azaciclobutano, sulfuro de trimetileno, tetrahidrofurano y pirrolidina.

[0018]

En la presente invención, ejemplos del “grupo arilo” pueden incluir, entre otros, un grupo fenilo, un grupo bencilo, un grupo indenilo, un grupo naftilo, un grupo fluorenilo, un grupo antranilo y un grupo fenantrenilo.

[0019]

En la presente invención, ejemplos del “grupo heteroarilo” pueden incluir, entre otros, un grupo tienilo, un grupo pirrolilo, un grupo pirazolilo, un grupo triazolilo, un grupo oxazolilo, un grupo oxadiazolilo, un grupo tiazolilo, un piridilo grupo, un grupo pirimidilo,

un grupo piridacilo, un grupo pirazinilo, un grupo quinolilo, un grupo quinoxalilo, un grupo benzotiofenilo, un grupo bencimidazolilo, un grupo benzotriazolilo y un grupo benzofuranilo.

[0020]

En la presente invención, ejemplos del "heterociclo de seis miembros" pueden incluir, entre otros, un anillo de piridina, un anillo de pirimidina y un anillo de piridazina.

[0021]

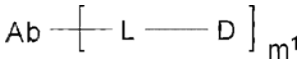
En la presente invención, "unido por espiro" se refiere a la situación en la que, como se ejemplifica en los ejemplos, A y un anillo de pirrolidina al que se une A, o E y un anillo de pirrolidina al que se une E forman un anillo de espiro.

[0022]

[Fármaco inmunoconjugado]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 50]



$m^1$ representa el número de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado, Ab representa un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, L representa un enlazador que une a Ab y D, y D representa un fármaco.

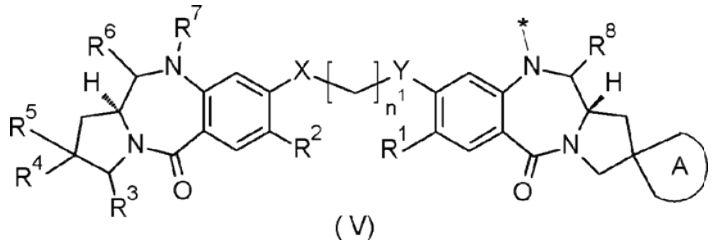
<Fármaco>

Se describirá el fármaco D conjugado en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención. El fármaco D de la presente invención es preferiblemente un compuesto antitumoral. El compuesto antitumoral desarrolla un efecto antitumoral, cuando una parte o la totalidad del enlazador se escinde en una célula tumoral y se libera la fracción del compuesto antitumoral. Cuando el enlazador y el fármaco se escinden en la parte de unión, se libera el compuesto antitumoral en la estructura original y se ejerce el efecto antitumoral original.

El compuesto antitumoral en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención es un derivado de pirrolobenzodiazepina (derivado de PBD) representado por la fórmula general (V):

[0023]

[Fórmula 51]



(V)

Esto se describirá a continuación.

El asterisco representa la unión al enlazador L.

[0024]

$n^1$ representa un número entero de 2 a 8 y es preferiblemente un número entero de 2 a 6 y más preferiblemente un número entero de 3 a 5.

La cadena de alquilo con el subíndice n1 como un número entero de 2 a 8, preferiblemente un número entero de 2 a 6 y más preferiblemente un número entero de 3 a 5, puede incluir un doble enlace.

[0025]

A representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros y es preferiblemente un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros (ciclopropano, ciclobutano o ciclopentano), más preferiblemente ciclopropano o ciclobutano y lo más preferible ciclopropano.

El anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro puede estar sustituido con uno a cuatro átomos de halógeno y puede estar sustituido preferiblemente con uno o dos átomos de flúor (por ejemplo, 2,2-difluorociclopropano).

[0026]

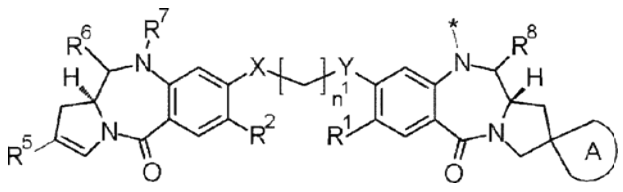
$R^1$ y $R^2$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi, un grupo tiol, un grupo alquiltio C1 a C6, un átomo de halógeno o -NR'R'' y son cada uno preferiblemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6 o un grupo hidroxi, más preferiblemente un grupo alcoxi C1 a C3 y lo más preferible un grupo metoxi.

[0027]

$R^3$, $R^4$ y $R^5$ son como se describen en cualquiera de los siguientes (i) a (iii).

(i) Si $R^3$ y $R^4$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^3$ y $R^4$ están unidos, para formar un doble enlace como se muestra a continuación:

[Fórmula 52]



$R^5$ representa un grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 1 o un grupo alquilo C1 a C6 que tiene

opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 2 y es preferiblemente un grupo arilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados de grupo 1.

[0028]

"Grupo arilo" en "grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 1" para $R^5$ es preferiblemente un grupo fenilo o un grupo naftilo y más preferiblemente un grupo fenilo.

[0029]

"Grupo heteroarilo" en "grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 1" para $R^5$ es preferiblemente un grupo tienilo, un grupo piridilo, un grupo pirimidilo, un grupo quinolilo, un grupo quinoxalilo o un grupo benzotiofenilo, más preferiblemente un grupo 2-tienilo, un grupo 3-tienilo, un grupo 2-piridilo, un grupo 3-piridilo o un grupo 4-piridilo, e incluso más preferiblemente un grupo 3-piridilo o un grupo 3-tienilo.

[0030]

Ejemplos de sustituyentes del grupo arilo o del grupo heteroarilo para $R^5$ pueden incluir, entre otros, los siguientes a) a j):

a) un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -NR'R'', -C (= NR')-NR''R''' y -NHC (=NR')-NR''R''',

c) un átomo de halógeno,

d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

e) un grupo alquiltio C1 a C6,

f) -NR'R'',

g) -C(=NR')-NR''R''',

h) -NHC(=NR')-NR''R''',

i) -NHCOR', y

j) un grupo hidroxi,

Aquí, R', R'' y R''' en b) y f) a i) representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6 y preferiblemente son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3.

[0031]

a) a j) son preferiblemente los siguientes:

a) un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno, más preferiblemente un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propoxi, un grupo i-propoxi o un trifluorometoxi, incluso más preferiblemente un grupo metoxi, un grupo etoxi o un grupo trifluorometoxi y lo más preferible un grupo metoxi;

b) un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -C(=NR')-NR''R''' o -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, -OCOR', -C(= NR')-NR''R''' y -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, incluso más preferiblemente un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo i-propilo, un grupo fluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo hidroximetilo, -$CH_2OCOMe$, -$CH_2$-NHC(=NH)-$NH_2$, o -$CH_2$-NHC(=NMe)-$NH_2$;
c) un átomo de halógeno, preferiblemente un átomo de flúor o un átomo de cloro;
d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5, más preferiblemente un grupo ciclopropoxi;
e) un grupo alquiltio C1 a C3, más preferiblemente un grupo metiltio o un grupo etiltio;
f) -NR'R'', en donde R' y R'' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -$NH_2$, -NHMe, -$NMe_2$, -NHEt o -$NEt_2$;
g) -C (= NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -C(=NH) -$NH_2$ o -C(=NMe)-$NH_2$;
h) -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -NHC(=NH)-$NH_2$ o -NHC(=NMe)-$NH_2$;
i) -NHCOR', en donde R' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -NHCOMe o -NHCOEt; y
j) un grupo hidroxi.

[0032]

El grupo arilo (preferiblemente, un grupo fenilo) o el grupo heteroarilo (preferiblemente, un grupo piridilo) para $R^5$ puede tener al menos un sustituyente en cualquier posición. Si una pluralidad de sustituyentes está presente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

[0033]

Si $R^5$ es un grupo arilo, cada sustituyente es preferiblemente a), b), d), g), h) o j), y más preferiblemente a), b), d) o j).

[0034]

Si $R^5$ es un grupo fenilo, $R^5$ puede tener un sustituyente en cualquier posición y puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente uno o dos sustituyentes están presentes en la posición 3 y/o la posición 4, y más preferiblemente un sustituyente está presente en la posición 4.

Si $R^5$ es un grupo naftilo, $R^5$ puede tener un sustituyente en cualquier posición y puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente un sustituyente está presente en la posición 6.

[0035]

Si $R^5$ es un grupo fenilo, $R^5$ es más preferiblemente un grupo fenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 3-metoxifenilo, un grupo 4-etoxifenilo, un grupo 4- (n-propoxi)-fenilo, un grupo 4-(i-propoxi)-fenilo, un grupo 4-ciclopropoxi-fenilo, un grupo 4-trifluorometilfenilo, un grupo 4-hidroximetil-fenilo, un grupo 4-acetoximetil-fenilo o un grupo 4-carbamimidamidometil-fenilo, e incluso más preferiblemente un grupo fenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 3-metoxifenilo, un grupo 4- ciclopropoxi-fenilo, un grupo 4-hidroximetil-fenilo, un grupo 4-acetoximetil-fenilo, un grupo 4-carbamimidamidometil-fenilo o un grupo 4-trifluorometilfenilo.

Si $R^5$ es un grupo naftilo, R5 es más preferiblemente un grupo naftilo o un grupo 6-metoxi-2-naftilo.

Lo más preferido es un grupo 4-metoxifenilo.

[0036]

Si $R^5$ es un grupo heteroarilo, cada sustituyente es preferiblemente a), b), d), g), h) o j), y más preferiblemente a) o b).

[0037]

Si $R^5$ es un grupo heteroarilo, $R^5$ puede tener al menos un sustituyente en cualquier posición. Si $R^5$ es un grupo 3-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 6 y/o la posición 5. Si $R^5$ es 2-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 5 y/o la posición 4, o en la posición 5 y/o la posición 6. Si $R^5$ es 4-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 2 y/o la posición 6.

[0038]

Si $R^5$ es un grupo heteroarilo, $R^5$ puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente tiene uno o dos sustituyentes, y preferiblemente tiene un sustituyente.

[0039]

Si $R^5$ es un grupo piridilo, $R^5$ es preferiblemente un grupo 6-metoxi-3-piridilo o un grupo 6-metil-3-piridilo.

Si $R^5$ es un grupo 3-tienilo o un grupo 6-quinoxalilo, $R^5$ está preferiblemente sin sustituir.

[0040]

“Grupo alquilo C1 a C6” en “grupo alquilo C1 a C6 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 2” para $R^5$ es preferiblemente un grupo alquilo C1 a C3, y más preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo.

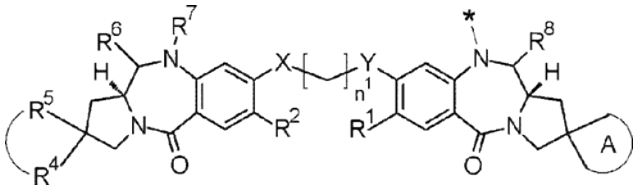
[0041]

Los sustituyentes en el "grupo alquilo C1 a C6 que tienen opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 2" para $R^5$ son cada uno un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C6 (preferiblemente, un grupo alcoxi C1 a C3), preferiblemente un grupo hidroxi, un grupo metoxi o un grupo etoxi, y más preferiblemente un grupo hidroxi.

[0042]

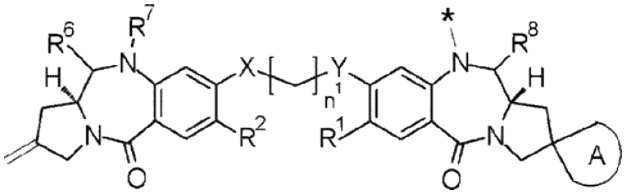
(ii) Si $R^3$ representa un átomo de hidrógeno, $R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, o $CH_2$= como se muestra a continuación:

[Fórmula 53]



o

[Fórmula 54]



El anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros puede estar sustituido con uno a cuatro átomos de halógeno y puede estar sustituido preferiblemente con uno o dos átomos de flúor.

$R^4$ y $R^5$ se combinan preferiblemente para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o $CH_2$=, más preferiblemente para formar ciclopropano, ciclobutano o $CH_2$= (grupo exometileno), e incluso más preferiblemente para formar ciclopropano.

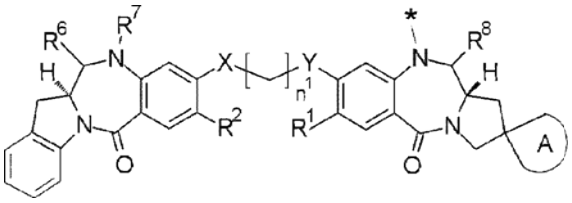
Si $R^4$ y $R^5$ se combinan para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, el anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o el heterociclo saturado de tres a cinco miembros es preferiblemente el mismo que A. De manera más preferible, A es un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros y $R^4$ y $R^5$ se combinan para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros, e incluso más preferiblemente A es un anillo de ciclopropano y $R^4$ y $R^5$ se combinan para formar un anillo de ciclopropano.

[0043]

(iii) $R^3$, $R^4$ y $R^5$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que R3 está unido y el átomo de carbono al que $R^4$ y $R^5$ están unidos, para formar un anillo de benceno o un heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 3.

La siguiente fórmula muestra el caso en el que $R^3$ y $R^4$ se combinan para formar un anillo de benceno que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes:

[Fórmula 55]



El anillo de benceno o el heterociclo pueden tener al menos un sustituyente en cualquier posición. Si una pluralidad de sustituyentes está presente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

[0044]

Cada sustituyente del anillo de benceno o el heterociclo es un átomo de halógeno, un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno, o un grupo alcoxi C1 a C6, preferiblemente un átomo de halógeno, un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno o un alcoxi C1 a C3, y más preferiblemente un átomo de halógeno, un grupo metilo o un grupo metoxi.

[0045]

"Anillo de benceno o heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes" es preferiblemente un anillo de benceno sin sustituir.

[0046]

$R^3$, $R^4$ y $R^5$ satisfacen más preferiblemente lo anterior (i).

[0047]

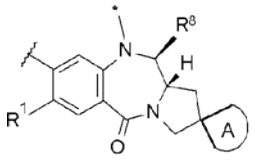
$R^6$ y $R^7$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, o $R^6$ y $R^7$ se combinan para representar un enlace imina (C=N).

[0048]

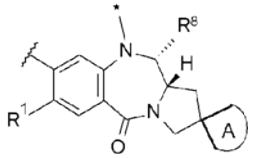
$R^8$ es un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3, preferiblemente un grupo hidroxi o un grupo metoxi y más preferiblemente un grupo hidroxi. $R^8$ puede ser un aducto de hidrogenosulfito ($OSO_3M$, en donde M es un catión metálico).

Dado que $R^8$ se une a un átomo de carbono asimétrico, a continuación se proporciona una configuración estérica representada por la estructura parcial (Va) o (Vb). Cada línea ondulada representa la unión a Y en la fórmula general (V), y cada asterisco representa la unión a L.

[Fórmula 56]



V (a)



V (b)

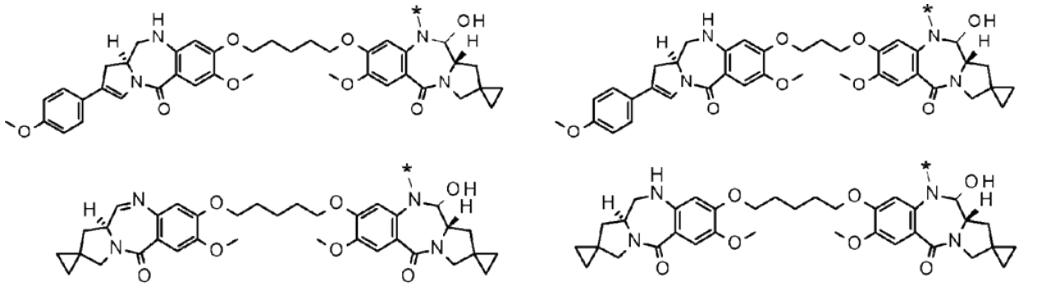
[0049]

X y Y son cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de sulfuro, y preferiblemente un átomo de oxígeno.

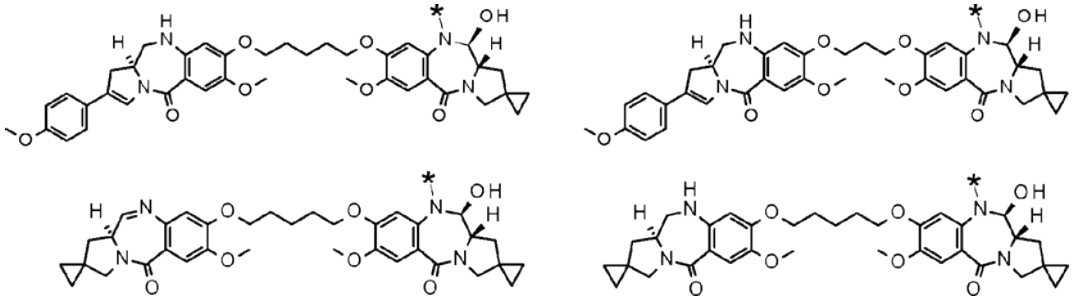
[0050]

El fármaco D de la presente invención es preferiblemente cualquier compuesto seleccionado del siguiente grupo:

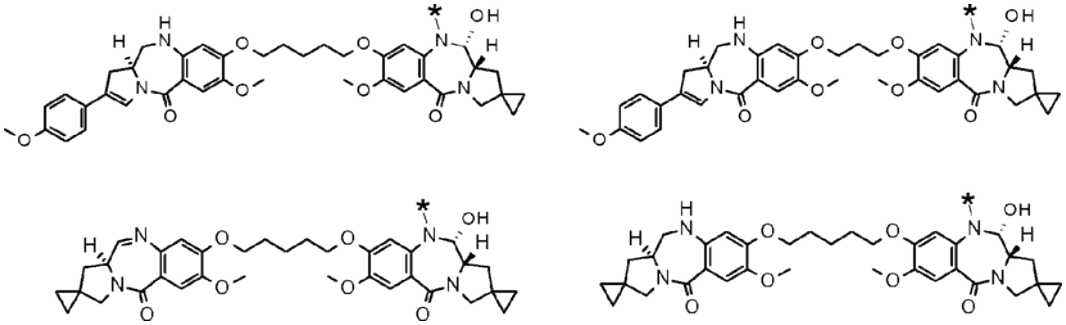
[Fórmula 57]



[Fórmula 58]



[Fórmula 59]



[0051]

<Estructura enlazadora>

Se describirá la estructura enlazadora para unir el fármaco antitumoral al anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención.

El enlazador L está representado por la siguiente fórmula:

-Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*

El asterisco representa la unión al átomo de nitrógeno en la posición N10' del fármaco D, Lb representa un separador que conecta La a un glicano o un glicano remodelado de Ab, o un separador que conecta La a una cadena lateral de un residuo de aminoácido (por ejemplo, cisteína o lisina) del anticuerpo Ab.

[0052]

B representa un grupo fenilo o un grupo heteroarilo, y es preferiblemente un grupo 1,4-fenilo, un grupo 2,5-piridilo, un grupo 3,6-piridilo, un grupo 2,5-pirimidilo o un 2,5-tienilo, y más preferiblemente un grupo 1,4-fenilo.

[0053]

Lp representa un enlazador que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible in vivo o en una célula objetivo. Lp es, por ejemplo, escindido por la acción de una enzima como la esterasa y la peptidasa.

Lp es un residuo peptídico compuesto de dos a siete (preferiblemente, de dos a cuatro) aminoácidos. Es decir, Lp se compone de un residuo oligopeptídico en el que se ponen en contacto de dos a siete aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Lp está unido en el extremo N a un grupo carbonilo de La en Lb-La- y forma en el extremo C un enlace amida con el grupo amino (-NH-) de la parte -NH-B-$CH_2$-O(C=O)- del enlazador. La unión entre el extremo C de Lp y -NH- es escindido por la enzima como la esterasa.

[0054]

Los aminoácidos que constituyen Lp no están limitados a aminoácidos particulares, y, por ejemplo, son L o D-aminoácidos y preferiblemente L-aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser no solo α-aminoácidos, sino que pueden incluir un aminoácido con estructura, por ejemplo, de β-alanina, ácido ε-aminocaproico o ácido γ-aminobutírico, y pueden incluir además un aminoácido no natural tal como un aminoácido N metilado.

[0055]

La secuencia de aminoácidos de Lp no se limita a una secuencia de aminoácidos particular y ejemplos de aminoácidos que constituyen Lp pueden incluir, entre otros, glicina (Gly; G), valina (Val; V), alanina (Ala; A), fenilalanina (Phe; F), ácido glutámico (Glu; E), isoleucina (Ile; I), prolina (Pro; P), citrulina (Cit), leucina (Leu; L), serina (Ser; S), lisina (Lys; K) y ácido aspártico (Asp; D). Se prefieren entre ellos la glicina (Gly; G), valina (Val; V), alanina (Ala; A) y citrulina (Cit).

Cualquiera de estos aminoácidos puede aparecer varias veces y Lp tiene una secuencia de aminoácidos que incluye aminoácidos seleccionados arbitrariamente.El patrón de liberación del fármaco puede controlarse mediante el tipo de aminoácido.

[0056]

Ejemplos específicos del enlazador Lp pueden incluir, entre otros, -GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI-, -GGPL-, -EGGVA, -PI-, -GGF-, DGGF-, (D-)D-GGF-, -EGGF-, -SGGF-, -KGGF-, -DGGFG-, -GGFGG-, -DDGGFG-, -KDGGFG-, y -GGFGGGF-.

Aquí, "(D-)V" indica D-valina, "(D)-P" indica D-prolina y "(D-)D" indica ácido D-aspártico.

[0057]

El enlazador Lp es preferiblemente cualquiera de los siguientes:
-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI-, y -GGPL-.

[0058]

El enlazador Lp es más preferiblemente cualquiera de los siguientes:
-GGVA-, -GGVCit-, y -VA-.

[0059]

Lb representa: i) un separador que conecta La a un glicano o glicano remodelado de Ab; o ii) un separador que conecta La a una cadena lateral de un residuo de aminoácido (por ejemplo, cisteína o lisina) del anticuerpo Ab.

Si Lb es i), Lb representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^3-C(=O)-$,

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^3-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-(CH_2)n^4-O-C(=O)-$

en donde,

$n^2$ representa un número entero de 1 a 3 (preferiblemente, 1 o 2), $n^3$ representa un número entero de 1 a 5 (preferiblemente, un número entero de 2 a 4, más preferiblemente, 2 o 4), y $n^4$ representa un número entero de 0 a 2 (preferiblemente, 0 o 1).

[0060]

Si Lb es i), La representa preferiblemente a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)_2-CH_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2-C(=O)-$,

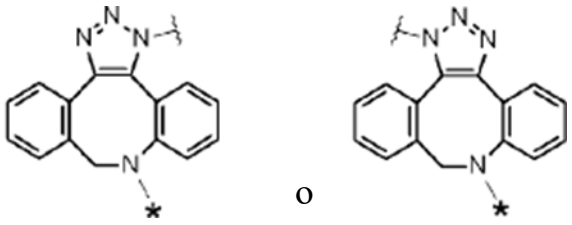
$-CH_2-OC(=O)-$, y $-OC(=O)-$, y

La es más preferiblemente $-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$ o $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$.

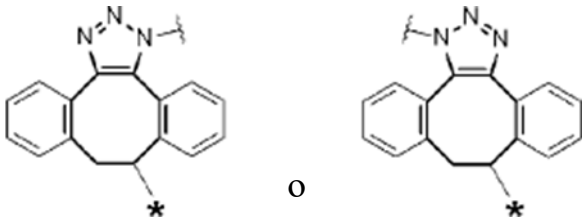
[0061]

El separador Lb no está limitado a un separador particular, y ejemplos del mismo pueden incluir, entre otros, un separador representado por las siguientes fórmulas.

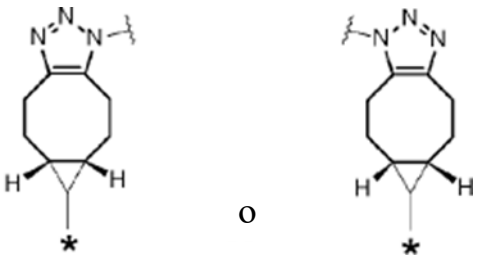
[Fórmula 60]

(Lb-1)  o

[Fórmula 61]

(Lb-2)  o

[Fórmula 62]

(Lb-3)  o

En las fórmulas estructurales para Lb que se muestran anteriormente, cada asterisco representa la unión a -(C=O) o -$(CH_2)n^4$ en el extremo izquierdo de La, y cada línea ondulada representa la unión a un glicano o glicano remodelado de Ab.

En cada fórmula estructural para Lb (Lb-1, Lb-2 o Lb-3) que se muestra anteriormente, el sitio del anillo de triazol formado a través de la reacción de clic de un grupo azida y DBCO proporciona estructuras de isómeros geométricos, y las moléculas de Lb existen como cualquiera una de las dos estructuras o como una mezcla de ambas. Existen fracciones de $m^1$ "-LD" por molécula del fármaco inmunoconjugado de la presente invención, y cualquiera de las dos estructuras existe o ambas coexisten como Lb (Lb-1, Lb-2 o Lb-3) en L de cada una de las fracciones de $m^1$ "-LD".

[0062]

Si Lb es i), L está representado preferiblemente por -Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*,

en donde

B es un grupo 1,4-fenilo,

Lp representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI-, y

-GGPL-,

La representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -$CH_2$-OC(=O)-, -OC(=O)-

, y

Lb representa cualquiera de las fórmulas estructurales anteriores para Lb

[0063]

Si Lb es i), L es más preferiblemente cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPI-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVK-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPL-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

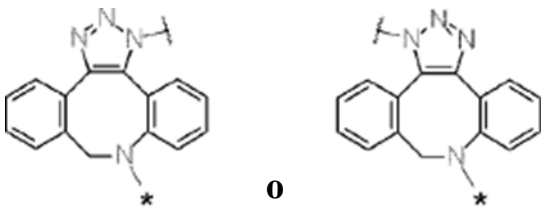
-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^2$-OC(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, -$Z^3$-$CH_2$-OC(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-

en donde

$Z^1$ representa la siguiente fórmula estructural como se describe para Lb:

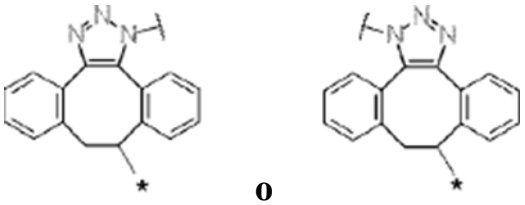
[Fórmula 63]



**o**

$Z^2$ representa la siguiente fórmula estructural como se describe para Lb:

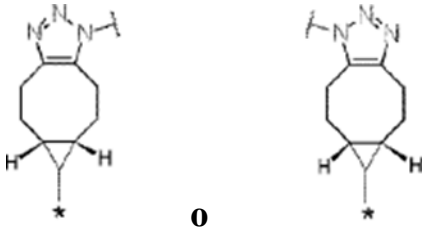
[Fórmula 64]



o

$Z^3$ representa la siguiente fórmula estructural como se describe para Lb:

[Fórmula 65]



o

, y B es un grupo 1,4-fenilo.

[0064]

L es de mayor preferencia cualquiera de los siguientes:

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)$2-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

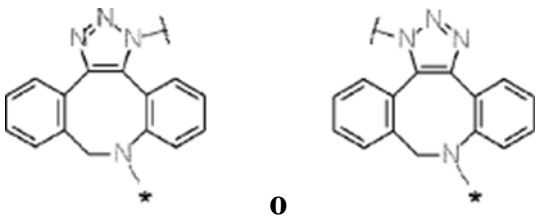
-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

y -$Z^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, en donde

B es un grupo 1,4-fenilo y $Z^1$ representa la siguiente fórmula estructural como se describe para Lb:

[Fórmula 66]



o

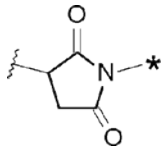
[0065]

Si Lb es ii) y el residuo de aminoácido es un residuo de cisteína, el separador Lb no está limitado a un separador particular, y sus ejemplos pueden incluir, entre otros, -(succinimida-3-il-N)-.

"-(succinimida-3-il-N)-" tiene una estructura representada por la siguiente estructura:

[0066]

[Fórmula 67]



En la fórmulas estructural que se muestra anteriormente, el asterisco representa la unión a La. La línea ondulada representa la unión al grupo tiol de un residuo de cisteína del anticuerpo a través de un enlace tiol, y la unión puede ser una conjugación de cisteína específica del sitio (RSC Adv., 2017, 7, 24828-24832, etc.).

[0067]

Si Lb es ii), L está representado por -Lb-La-Lp-NH-B-$CH_2$-O(C=O)-*, en donde B is un grupo 1,4-fenilo;

Lp representa a cualquiera de -GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, y -GGFG-;

La representa -$(CH_2)n^9$-C(=O)- o -$(CH_2CH_2)n^{10}$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)n^{11}$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, en donde

$n^9$ representa un número entero de 2 a 7 (preferiblemente, un número entero de 2 a 5, más preferiblemente 2, o 5), $n^{10}$ representa un número entero de 1 a 3 (preferiblemente, 1) y $n^{11}$ representa un número entero de 6 a 10 (preferiblemente, 8); y

Lb representa -(succinimida-3-il-N)-.

[0068]

Si Lb es ii), L es preferiblemente cualquiera de los siguientes:

-(succinimida-3-il-N)-$CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-,

-(succinimida-3-il-N)-$(CH_2)_5$-C(=O)-GGVA-NH-B-$CH_2$-OC(=O)-, o,

-(succinimida-3-il-N)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B- $CH_2$-OC(=O)-

en donde B es un grupo 1,4-fenilo.

[0069]

Se deduce que el fármaco inmunoconjugado de la presente invención exhibe actividad antitumoral a través de un proceso en el que la mayoría de las moléculas del fármaco inmunoconjugado migran a las células tumorales, y una porción de enlace (por ejemplo, Lp) se escinde mediante una enzima o similar para activar el fármaco inmunoconjugado, que libera la porción del fármaco D (en adelante, denominado como fármaco libre (descrito más adelante)).

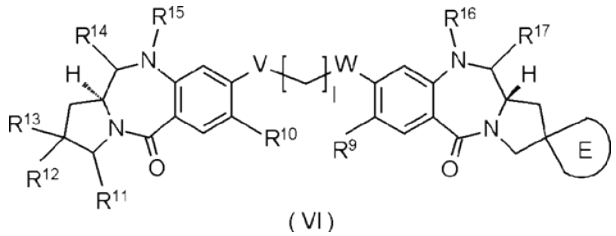
Por lo tanto, es preferible que el fármaco inmunoconjugado de la presente invención sea estable fuera de las células tumorales.

<Fármaco libre e intermedio de producción>

El intermedio y fármaco libre del fármaco inmunoconjugado de la presente invención están representados por la siguiente fórmula:

[0070]

[Fórmula 68]



(VI)

Esto se describirá a continuación.

[0071]

El fármaco libre de la presente invención se genera a través de un proceso en el que el fármaco inmunoconjugado migra a las células tumorales y luego se escinde la porción del enlazador L en el fármaco inmunoconjugado. Ejemplos del fármaco libre pueden incluir, entre otros, fármacos 1 a 16 en los ejemplos 45 a 54 y 150 a 152.

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención se produce usando el intermedio de producción.

[0072]

El fármaco libre para el fármaco inmunoconjugado de la presente invención corresponde al caso en el que (a) $R^{16}$ y $R^{17}$ se combinan para formar un enlace imina (N=C).

El intermedio de producción para el fármaco inmunoconjugado de la presente invención corresponde al caso en el que (b) $R^{16}$ está representado por J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O (C=O)-*.

En consecuencia, 1 y $n^1$, E y A, $R^9$ y $R^1$, $R^{10}$ y $R^2$, $R^{11}$ y $R^3$, $R^{12}$ y $R^4$, $R^{13}$ y $R^5$, $R^{14}$ y $R^6$, $R^{15}$ y $R^7$, V y X, W e Y, grupo 7 y grupo 1, grupo 8 y grupo 2, grupo 9 y grupo 3, grupo 10 y grupo 4, grupo 11 y grupo 5, y grupo 12 y grupo 6 son sinónimos en las fórmulas respectivamente.

[0073]

1 representa un número entero de 2 a 8, y es preferiblemente un número entero de 2 a 6, y más preferiblemente un número entero de 3 a 5.

La cadena alquílica en donde 1 es un número entero de 2 a 8, preferiblemente un número entero de 2 a 6, y más preferiblemente un número entero de 3 a 5, puede incluir un doble enlace.

[0074]

E representa un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, y es preferiblemente un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros (ciclopropano, ciclobutano o ciclopentano), más preferiblemente ciclopropano o ciclobutano, y lo más preferible ciclopropano.

El anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros unido por espiro puede estar sustituido con uno a cuatro átomos de halógeno y puede estar sustituido preferiblemente con uno o dos átomos de flúor (por ejemplo, 2,2-difluorociclopropano).
[0075]

$R^9$ y $R^{10}$ representan cada uno independientemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxi, un grupo tiol, un grupo alquiltio C1 a C6, un átomo de halógeno o -NR'R'', y cada uno es preferiblemente un grupo alcoxi C1 a C6, un grupo alquilo C1 a C6, o un grupo hidroxi, más preferiblemente un grupo alcoxi C1 a C3, y lo más preferible un grupo metoxi.
[0076]

$R^{11}$, $R^{12}$ y $R^{13}$ son como se describen en cualquiera de los siguientes (i) a (iii).

Si $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^3$ y $R^4$ están unidos, para formar un enlace doble, $R^{13}$ representa un grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 7 o un grupo alquilo C1 a C6 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 8, y es preferiblemente un grupo arilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 7.
[0077]

"Grupo arilo" en "grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 7" para $R^{13}$ es preferiblemente un grupo fenilo o un grupo naftilo y más preferiblemente un grupo fenilo.
[0078]

"Grupo heteroarilo" en "grupo arilo o grupo heteroarilo que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 7" para $R^{13}$ es preferiblemente un grupo tienilo, un grupo piridilo, un grupo pirimidilo, un grupo quinolilo, un grupo quinoxalilo o un grupo benzotiofenilo, más preferiblemente un grupo 2-tienilo, un grupo 3-tienilo, un grupo 2-piridilo, un grupo 3-piridilo o un grupo 4-piridilo, e incluso más preferiblemente un grupo 3-piridilo o un grupo 3-tienilo.
[0079]

Ejemplos de sustituyentes del grupo arilo o del grupo heteroarilo para $R^{13}$ pueden incluir, entre otros, los siguientes a) a j):

a) un grupo alcoxi C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno,

b) un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -NR'R'', -C (= NR')-NR''R''' y -NHC (=NR')-NR''R''',

c) un átomo de halógeno,

d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5,

e) un grupo alquiltio C1 a C6,

f) -NR'R'',

g) -C(=NR')-NR''R''',

h) -NHC(=NR')-NR''R''',

i) -NHCOR', y

j) un grupo hidroxi,

Aquí, R', R'' y R''' en b) y f) a i) representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C6 y preferiblemente son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3.

[0080]

a) a j) son preferiblemente los siguientes:

a) un grupo alcoxi C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno, más preferiblemente un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propoxi, un grupo i-propoxi o un grupo trifluorometoxi, incluso más preferiblemente un grupo metoxi, un grupo etoxi o un grupo trifluorometoxi, lo más preferible un grupo metoxi;

b) un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxi, -OCOR', -C(=NR')-NR''R''', y -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con cualquiera seleccionado de uno a tres átomos de halógeno, un grupo hidroxilo, -OCOR', -C(= NR')-NR''R''', y -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, incluso más preferiblemente un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo i-propilo, un grupo fluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo hidroximetilo, $-CH_2OCOMe$, $-CH_2$-NHC(=NH)-$NH_2$, o $-CH_2$-NHC(=NMe)-$NH_2$;

c) un átomo de halógeno, preferiblemente un átomo de flúor o un átomo de cloro;

d) un grupo cicloalcoxi C3 a C5, más preferiblemente un grupo ciclopropoxi;

e) un grupo alquiltio C1 a C3, más preferiblemente un grupo metiltio o un grupo etiltio;

f) -NR'R'', en donde R' y R'' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente $-NH_2$, -NHMe, $-NMe_2$, -NHEt o $-NEt_2$;

g) -C (= NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -C(=NH)-$NH_2$ o -C(=NMe)-$NH_2$;

h) -NHC(=NR')-NR''R''', en donde R', R'' y R''' son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -NHC(=NH)-$NH_2$ o -NHC(=NMe)-$NH_2$;

i) -NHCOR', en donde R' es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C3, más preferiblemente -NHCOMe o -NHCOEt; y
j) un grupo hidroxi.

[0081]

El grupo arilo (preferiblemente, un grupo fenilo) o el grupo heteroarilo (preferiblemente, un grupo piridilo) para $R^{13}$ puede tener al menos un sustituyente en cualquier posición. Si una pluralidad de sustituyentes está presente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

[0082]

Si $R^{13}$ es un grupo arilo, cada sustituyente es preferiblemente a), b), d), g), h) o j), y más preferiblemente a), b), d) o j).

[0083]

Si $R^{13}$ es un grupo fenilo, $R^{13}$ puede tener un sustituyente en cualquier posición y puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente uno o dos sustituyentes están presentes en la posición 3 y/o la posición 4, y más preferiblemente un sustituyente está presente en la posición 4.

Si $R^5$ es un grupo naftilo, $R^5$ puede tener un sustituyente en cualquier posición y puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente un sustituyente está presente en la posición 6.

[0084]

Si $R^{13}$ es un grupo fenilo, $R^{13}$ es más preferiblemente un grupo fenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 3-metoxifenilo, un grupo 4-etoxifenilo, un grupo 4- (n-propoxi)-fenilo, un grupo 4-(i-propoxi)-fenilo, un grupo 4-ciclopropoxi-fenilo, un grupo 4-trifluorometilfenilo, un grupo 4-hidroximetil-fenilo, un grupo 4-acetoximetil-fenilo o un grupo 4-carbamimidamidometil-fenilo, e incluso más preferiblemente un grupo fenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 3-metoxifenilo, un grupo 4- ciclopropoxi-fenilo, un grupo 4-hidroximetil-fenilo, un grupo 4-acetoximetil-fenilo, un grupo 4-carbamimidamidometil-fenilo o un grupo 4-trifluorometilfenilo.

Si $R^{13}$ es un grupo naftilo, $R^{13}$ es más preferiblemente un grupo naftilo o un grupo 6-metoxi-2-naftilo.

El más preferido es un grupo 4-metoxifenilo.

[0085]

Si $R^{13}$ es un grupo heteroarilo, cada sustituyente es preferiblemente a), b), d), g), h) o j), y más preferiblemente a) o b).

Si $R^{13}$ es un grupo heteroarilo, $R^{13}$ puede tener al menos un sustituyente en cualquier posición.

Si $R^{13}$ es un grupo 3-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 6 y/o la posición 5. Si $R^{13}$ es 2-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 5 y/o la posición 4, o en la posición 5 y/o la posición 6. Si $R^{13}$ es 4-piridilo, sus sustituyentes están presentes preferiblemente en la posición 2 y/o la posición 6.

Si $R^{13}$ es un grupo heteroarilo, $R^{13}$ puede tener una pluralidad de sustituyentes, y preferiblemente tiene uno o dos sustituyentes, y preferiblemente tiene un sustituyente.

Si $R^{13}$ es un grupo piridilo, $R^{13}$ es preferiblemente un grupo 6-metoxi-3-piridilo o un grupo 6-metil-3-piridilo.

Si $R^{13}$ es un grupo 3-tienilo o un grupo 6-quinoxalilo, $R^{13}$ está preferiblemente sin sustituir.

[0086]

"Grupo alquilo C1 a C6" en "grupo alquilo C1 a C6 que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 8" para $R^{13}$ son preferiblemente un grupo alquilo C1 a C3, y más preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo.

Los sustituyentes en el "grupo alquilo C1 a C6 que tienen opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 8" para $R^{13}$ son cada uno un átomo de halógeno, un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C6 (preferiblemente, un grupo alcoxi C1 a C3), preferiblemente un grupo hidroxi, un grupo metoxi o un grupo etoxi, y más preferiblemente un grupo hidroxi.

[0087]

Si $R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^{12}$ y $R^{13}$ están unidos, para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, o $CH_2$=.

El anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros puede estar sustituido con uno a cuatro átomos de halógeno y puede estar sustituido preferiblemente con uno o dos átomos de flúor.

$R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan preferiblemente para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros

o $CH_2$=, más preferiblemente para formar ciclopropano, ciclobutano o $CH_2$=(grupo exometileno), e incluso más preferiblemente para formar ciclopropano.

Si $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o un heterociclo saturado de tres a cinco miembros, el anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros o el heterociclo saturado de tres a cinco miembros es preferiblemente el mismo que E. De manera más preferible, E es un anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros y R12 y R13 se combinan para formar un

anillo de hidrocarburo saturado de tres a cinco miembros, e incluso más preferiblemente E es un anillo de ciclopropano y $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo de ciclopropano.

[0088]

$R^{11}$, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan, junto con el átomo de carbono al que $R^{11}$ está unido y el átomo de carbono al que $R^{12}$ y $R^{13}$ están unidos, para formar un anillo de benceno o un heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes seleccionados del grupo 9;

El anillo de benceno o el heterociclo pueden tener al menos un sustituyente en cualquier posición. Si una pluralidad de sustituyentes está presente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Cada sustituyente del anillo de benceno o heterociclo es un átomo de halógeno, un grupo alquilo C1 a C6 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno, o un grupo alcoxi C1 a C6, preferiblemente un átomo de halógeno, un grupo alquilo C1 a C3 sustituido opcionalmente con uno a tres átomos de halógeno o un alcoxi C1 a C3, y más preferiblemente un átomo de halógeno, un grupo metilo o un grupo metoxi.

"Anillo de benceno o heterociclo de seis miembros que tiene opcionalmente uno o más sustituyentes" es preferiblemente un anillo de benceno sin sustituir.

[0089]

$R^{11}$, $R^{12}$ y $R^{13}$ satisfacen de mayor preferencia lo anterior (i).

[0090]

$R^{14}$ y $R^{15}$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, o $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para representar un enlace imina (C=N).

[0091]

V y W son cada uno independientemente un átomo de oxígeno, un átomo de nitrógeno o un átomo de sulfuro, y preferiblemente un átomo de oxígeno.

[0092]

$R^{16}$ y $R^{17}$ son tales que:

(a) $R^{16}$ y $R^{17}$ se combinan para formar un enlace imina (N=C); o

(b) $R^{16}$ representa J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O (C=O)-* y $R^{17}$ representa un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3.

[0093]

En el caso de (b) $R^{16}$ es J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O(C=O)-*, el asterisco en la fórmula representa la unión a la posición N10' del anillo de pirrolobenzodiazepina representado por la fórmula anterior.

[0094]

B’ representa un grupo fenilo o un grupo heteroarilo; y es preferiblemente un grupo 1,4-fenilo un grupo 2,5-piridilo, un grupo 3,6-piridilo, un grupo 2,5-pirimidilo o un 2,5-tienilo, y más preferiblemente un grupo 1,4-fenilo.

[0095]

Lp’ representa un enlazador que consiste en una secuencia de aminoácidos escindible in vivo o en una célula objetivo. Lp es, por ejemplo, escindido por la acción de una enzima como la esterasa y la peptidasa.

[0096]

Ejemplos específicos del enlazador Lp’ pueden incluir, entre otros, -GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI-, -GGPL-, -EGGVA, -PI-, -GGF-, DGGF-, (D-)D-GGF-, -EGGF-, -SGGF-, -KGGF-, -DGGFG-, -GGFGG-, -DDGGFG-, -KDGGFG-, y -GGFGGGF-.

Aquí, “(D-)V” indica D-valina, “(D)-P” indica D-prolina y “(D-)D” indica ácido D-aspártico.

[0097]

El enlazador Lp’ es preferiblemente como sigue:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, -GG(D-)PI-, o -GGPL-.

Ejemplos más preferidos son -GGVA-, -GGVCit- y -VA-.

[0098]

La’ representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-C(=O)-NH-(CH_2CH_2)n^7-C(=O)-$,

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^7-CH_2-C(=O)-$,

$-C(=O)-(CH_2CH_2)n^6-NH-C(=O)-(CH_2CH_2O)n^7-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-(CH_2)n^8-O-C(=O)-$,

$-(CH_2)n^{12}-C(=O)-$, y ,$-(CH_2CH_2)n^{13}-C(=O)-NH-(CH_2CH_2O)n^{14}-CH_2CH_2-C(=O)-$

En las fórmulas, n6 representa un número entero de 1 a 3 (preferiblemente, 1 o 2), $n^7$ representa un número entero de 1 a 5 (preferiblemente, un número entero de 2 a 4, más preferiblemente, 2 o 4),

$n^8$ representa un número entero de 0 a 2 (preferiblemente, 0 o 1), $n^{12}$ representa un número entero de 2 a 7 (preferiblemente, un número entero de 2 a 5, más preferiblemente, 2 o 5), $n^{13}$ representa un número entero de 1 a 3 (preferiblemente, 1) y $n^{14}$ representa un número entero de 6 a 10 (preferiblemente, 8).

[0099]

La’ representa preferiblemente a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$-C(=O)-CH_2CH_2-C(=O)-$, $-C(=O)-(CH_2CH_2)_2-C(=O)-$,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -$CH_2$-OC(=O)-, -OC(=O)-,

-$(CH_2)_2$-C(=O)-, -$(CH_2)_5$-C(=O)-, y -$CH_2CH_2$-C(=O)-NH -$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O)-.

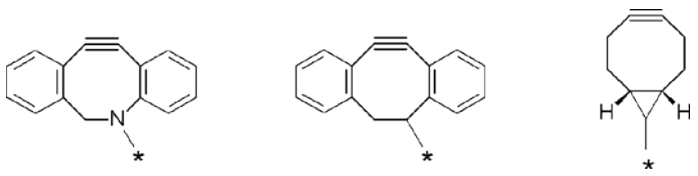
[0100]

La' es más preferiblemente -C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-, o -$(CH_2)_5$-C(=O)-.

[0101]

J no está limitado a una estructura particular y puede ser cualquier estructura cíclica, incluida una estructura alquina que reacciona con un grupo azida para formar un anillo de 1,2,3-triazol, y ejemplos del mismo pueden incluir, entre otros, compuestos representados por las siguientes fórmulas:

[Fórmula 69]



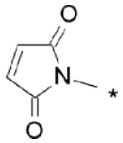

[0102]

En las fórmulas estructurales para J que se muestran anteriormente, cada asterisco representa la unión a -(C=O) o -$(CH_2)n^8$ en el extremo izquierdo de La'.

[0103]

Alternativamente, J puede ser un compuesto que se une a una cadena lateral de un residuo de aminoácido (por ejemplo, cisteína o lisina) del anticuerpo Ab o un átomo de halógeno, y ejemplos de J pueden incluir, entre otros, un grupo maleimidilo representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 70]




En el grupo maleimidilo que se muestra anteriormente, el asterisco representa la unión a -$(CH_2)n^{12}$ o -$(CH_2CH_2)n^{13}$ en el extremo izquierdo de La'.

[0104]

$R^{16}$ está representado preferiblemente por J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O(C=O)-*, en donde B' es un grupo 1,4-fenilo;

Lp' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-GGVA-, -GG-(D-)VA-, -VA-, -GGFG-, -GGPI-, -GGVCit-, -GGVK-, GG(D-)PI-, y

-GGPL-;

La' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-,

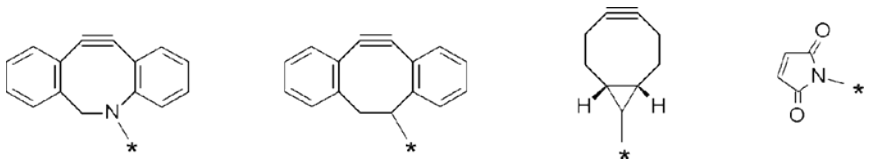
-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-,

-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -OC(=O)-, -$CH_2$-OC(=O)-,

-$(CH_2)_5$-C(=O)- y -$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O); y

J representa a cualquiera de las fórmulas estructurales:

[Fórmula 71]



en donde, en la fórmula estructural para J,

cada asterisco representa la unión a La'.

[0105]

$R^{16}$ es más preferiblemente cualquiera seleccionado del siguiente grupo:

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GG-(D-)VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPI-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGFG-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVK-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGPL-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^2$-OC(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, $J^3$-$CH_2$-OC(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

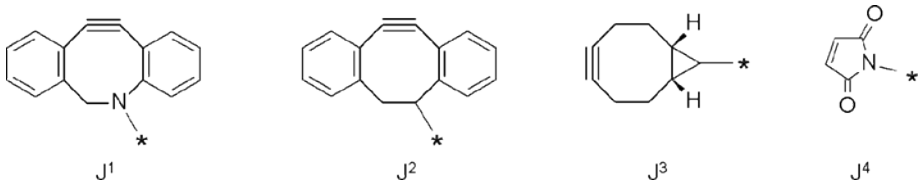
$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-, y

$J^4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_8$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-

en donde $J^1$, $J^2$, $J^3$ y $J^4$ representan fórmulas estructurales representadas por la siguiente:

[Fórmula 72]



$J^1$ $J^2$ $J^3$ $J^4$

en donde, en las fórmulas estructurales para $J^1$, $J^2$, $J^3$ y $J^4$,

cada asterisco representa la unión a un grupo adyacente a $J^1$, $J^2$, $J^3$ o $J^4$, y B' es un grupo 1,4-fenilo.

[0106]

$R^{16}$ es de mayor preferencia cualquiera de los siguientes:

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-GGVCit-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2)_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-C(=O)-NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

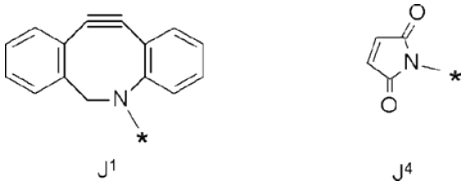
$J^1$-C(=O)-$CH_2CH_2$-NH-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_4$-$CH_2CH_2$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-,

$J^4$-$(CH_2)_5$-C(=O)-VA-NH-B'-$CH_2$-OC(=O)-

en donde

B' es un grupo 1,4-fenilo, y

$J^1$ y $J^4$ están representados por las siguientes fórmulas estructurales para J: [Fórmula 73]



$J^1$ $J^4$

en donde, en las fórmulas estructurales para $J^1$ y $J^4$,

cada asterisco representa la unión a un grupo adyacente a $J^1$ y $J^4$.

[0107]

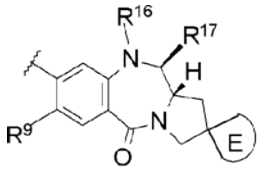
$R^{17}$ es un grupo hidroxi o un grupo alcoxi C1 a C3, y preferiblemente un grupo hidroxi o un grupo metoxi.

$R^{17}$ puede ser aducto de hidrogenosulfito ($OSO_3M$, en donde M es un catión metálico).

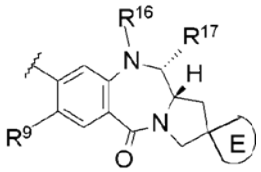
Dado que $R^{17}$ se une a un átomo de carbono asimétrico, a continuación se proporciona una configuración estérica representada por la estructura parcial (VIa) o (VIb).

Cada línea ondulada representa la unión a W en el intermedio y el fármaco libre representados por la fórmula general (VI).

[Fórmula 74]




VI(a)

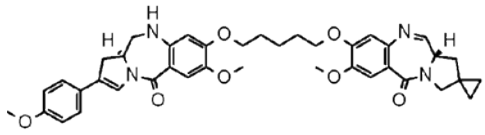


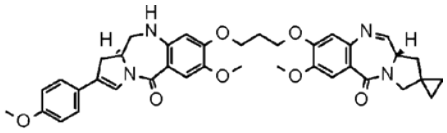

VI(b)

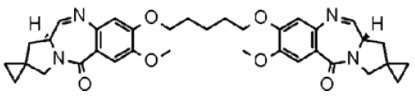
[0108]

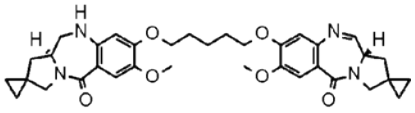
El fármaco libre es preferiblemente un compuesto seleccionado del siguiente grupo:

[Fórmula 75]









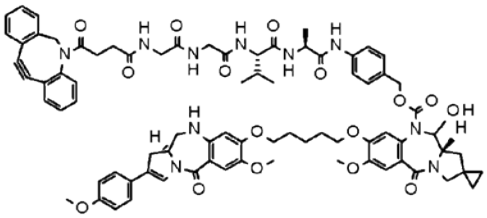
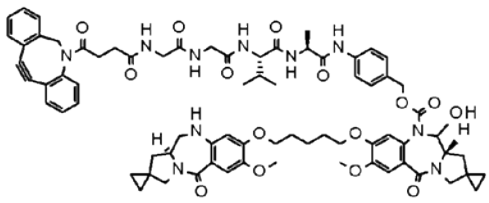
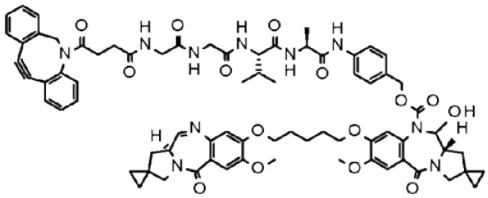
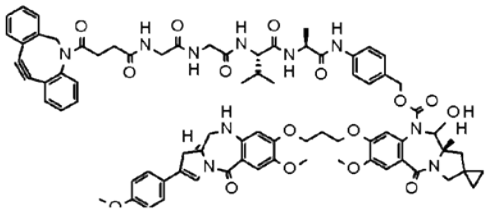
[0109]

El fármaco libre en algunos casos se libera en las células tumorales con una parte del enlazador L unido, pero es un fármaco superior que ejerce un efecto antitumoral superior incluso en dicho estado. El fármaco libre, después de migrar a las células tumorales, en algunos casos se oxida aún más para causar la deshidrogenación de $R^{16}$ y $R^{17}$, pero ejerce un efecto antitumoral superior incluso en dicho estado.

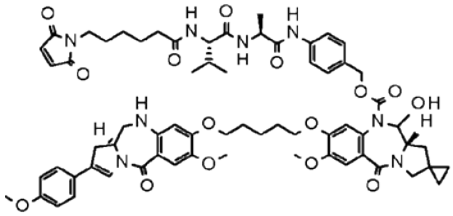
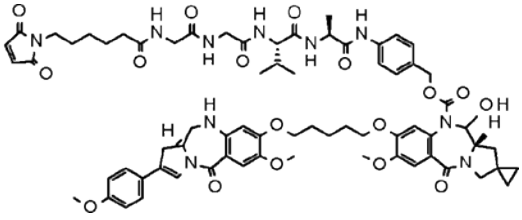
[0110]

El intermedio de producción es preferiblemente un compuesto seleccionado del siguiente grupo:

[Fórmula 76]

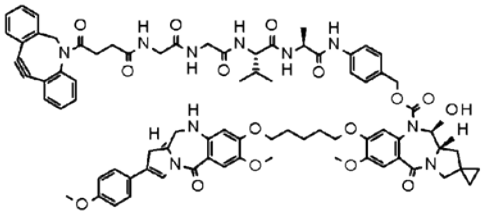
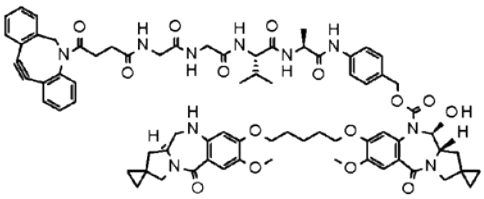
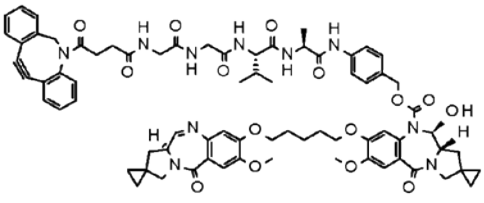
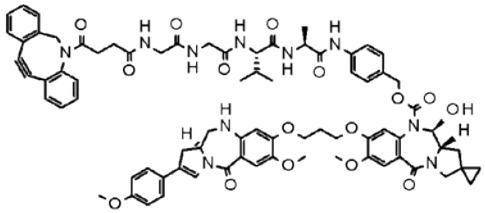
[Fórmula 77]

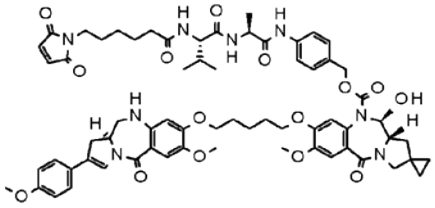
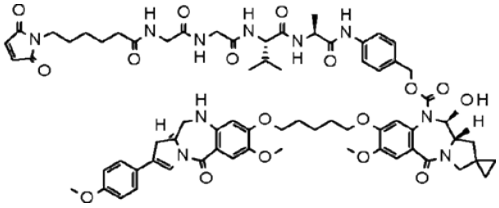
[0111]

El intermedio de producción es preferiblemente un compuesto seleccionado del siguiente grupo:

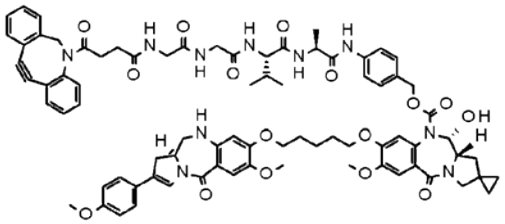
[Fórmula 78]

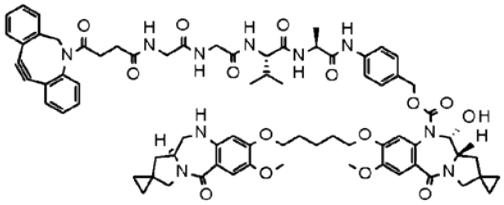





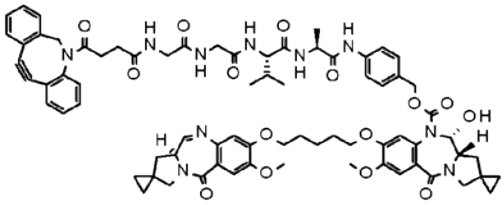
[Fórmula 79]

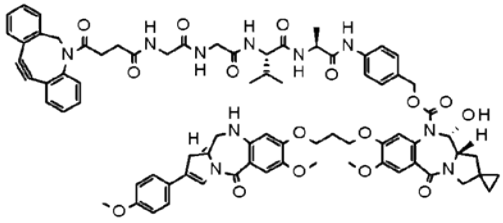



[Fórmula 80]

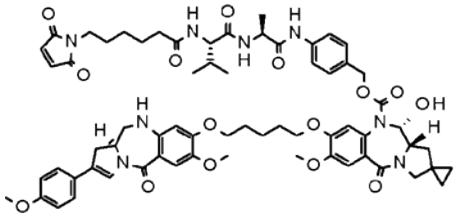


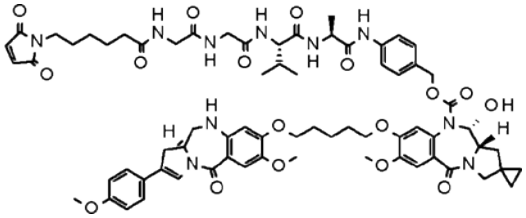






[Fórmula 81]





[0112]

<Anticuerpo>

En la presente invención, “cáncer” y “tumor” se emplean con el mismo significado.

En la presente invención, un “gen” se refiere a nucleótidos o a una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos de proteína o una hebra complementaria de la misma. El significado de un “gen” abarca, por ejemplo, un polinucleótido, un oligonucleótido, ADN, ARNm, ADNc y ARN como una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos de proteína o una hebra complementaria de la misma. Ejemplos del “gen CLDN6” de la presente invención incluyen ADN, ARNm, ADNc, y ARNc que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína CLDN6.

En la presente invención, “nucleótidos”, “polinucleótido” y “secuencia de nucleótidos” tienen el mismo significado que el de “ácidos nucleicos”, y el significado de “nucleótidos” y “secuencia de nucleótidos” abarca, por ejemplo, ADN, ARN, una sonda, un oligonucleótido, un polinucleótido y un cebador.

En la presente invención, “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente.

En la presente invención, “CLDN6” se emplea con el mismo significado que la proteína CLDN6.

[0113]

En la presente invención, las “células” incluyen células en un animal individual y células cultivadas.

En la presente invención, “actividad citotóxica celular” se refiere a causar un cambio patológico en las células de cualquier manera, lo que incluye causar, no solo traumas directos, sino también todo tipo de daño en la estructura y función de las células, como la escisión del ADN, la formación de un dímero de nucleótidos, la escisión de un cromosoma, el daño del aparato mitótico y la disminución de actividad de varias enzimas.

[0114]

En la presente invención, un “fragmento funcional de un anticuerpo” también se denomina “fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo”, y significa un fragmento parcial de un anticuerpo con actividad de unión a un antígeno, y ejemplos de los mismos pueden incluir, entre otros, Fab, F(ab’)2, Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Además, el significado de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo abarca Fab’, un fragmento monovalente de una región variable de un anticuerpo obtenido mediante el tratamiento de F(ab’)2 en condiciones reductoras. Sin embargo, no hay limitación para esas moléculas siempre que las moléculas tengan la capacidad de unión a un antígeno. Esos fragmentos de unión a antígeno incluyen no solo aquellos obtenidos al tratar una molécula de longitud completa de una proteína del anticuerpo con una enzima apropiada, sino también proteína producida en una célula huésped apropiada al usar un gen del anticuerpo genéticamente modificado.

El fragmento funcional de la presente invención incluye un fragmento funcional que tiene asparagina bien conservada (Asn297) para ser modificada con un glicano unido a N en la región Fc de la cadena pesada de la IgG y aminoácidos alrededor de Asn297, mientras retiene la actividad de unión a un antígeno.

[0115]

En la presente invención, un “epítopo” se refiere a un péptido parcial o estructura tridimensional parcial de un antígeno al que se une (un péptido parcial o estructura tridimensional parcial de CLDN6) un anticuerpo particular (por ejemplo, un anticuerpo anti-CLDN6). Un epítopo como tal un péptido parcial (por ejemplo, un péptido parcial de CLDN6) puede determinarse con el uso de cualquier método bien conocido por los expertos en la materia, tal como inmunoensayo.

[0116]

Un “CDR” en la presente invención se refiere a una región determinante de complementariedad. Se sabe que cada una de las cadenas pesadas y cadenas livianas de una molécula del anticuerpo tiene tres CDR. Las CDR, que también se denominan regiones hipervariables, se encuentran en regiones variables de las cadenas pesadas y cadenas

livianas de un anticuerpo y es un sitio con una variación particularmente alta de la estructura primaria. Tres CDR se ubican por separado en la estructura primaria de la cadena polipeptídica de cada una de las cadenas pesadas y cadenas livianas. Con respecto a las CDR de anticuerpos, en el presente documento, las CDR de una cadena pesada se refieren a CDRH1, CDRH2 y CDRH3 del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, y las CDR de una cadena liviana se refieren a CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del extremo amino de la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana. Estos sitios están ubicados en la proximidad entre sí en la estructura tridimensional, determinando la especificidad de un anticuerpo para unirse.

[0117]

En la presente invención, “hibridar en condiciones rigurosas” se refiere a la hibridación en la solución de hibridación disponible en el comercio ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) a 68 °C, o la hibridación utilizando un filtro con ADN fijado a la misma en presencia de 0,7 a 1,0 M NaCl a 68 °C y lavado a 68 °C con 0,1 a 2 x solución de SSC (1 x solución de SSC contiene 150 mM NaCl y 15 mM de citrato de sodio), o hibridación en condiciones equivalentes a las mismas.

En la presente invención, “uno a varios” se refiere a 1 a 10, uno a nueve, uno a ocho, uno a siete, uno a seis, uno a cinco, uno a cuatro, uno a tres, o uno o dos.

[0118]

En la presente invención, un anticuerpo capaz de reconocer o unirse a CLDN6 y capaz de reconocer o unirse a CLDN6 y CLDN9 se denomina ocasionalmente como un “anticuerpo anti-CLDN6” y un “anticuerpo anti-CLDN6/CLDN9”, respectivamente. Tales anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos. Un anticuerpo capaz de reconocer o unirse a CLDN6 y CLDN9 se denomina ocasionalmente como un “anticuerpo anti-CLDN6”.

[0119]

El anticuerpo que se va a utilizar para el fármaco inmunoconjugado de la presente invención se refiere a inmunoglobulina, y es una molécula que incluye un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. El anticuerpo de la presente invención puede ser de cualquier clase de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY, y se prefiere IgG. La subclase puede ser cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, y se prefieren IgG1, IgG2 e IgG4. Si se usa IgG1 o IgG4, la función efectora puede ajustarse al sustituir algunos de los residuos de aminoácidos en la región constante (véanse los documentos WO 88/07089, WO 94/28027, WO 94/29351).

El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie, que preferiblemente incluye, entre otras, un humano, una rata, un ratón y un conejo. Si el anticuerpo se deriva de especies distintas de la especie humana, se quimeriza o humaniza preferiblemente con el

uso de una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, y es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Ejemplos de anticuerpos monoclonales pueden incluir, entre otros, anticuerpos monoclonales derivados de animales no humanos tales como anticuerpos de rata, anticuerpos de ratón y anticuerpos de conejo; anticuerpos quiméricos; anticuerpos humanizados; anticuerpos humanos; fragmentos funcionales de ellos; y variantes modificadas de ellos.

[0120]

El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo capaz de dirigirse a una célula tumoral. Específicamente, el anticuerpo, al que se conjuga un fármaco que tiene actividad antitumoral a través de un enlazador, tiene preferiblemente una o más propiedades de reconocer una célula tumoral, unirse a una célula tumoral, incorporarse e internalizarse en una célula tumoral y dañar una célula tumoral.

La actividad de unión del anticuerpo contra las células tumorales se puede confirmar mediante citometría de flujo. La incorporación del anticuerpo en células tumorales se puede confirmar con el uso de (1) un ensayo para visualizar un anticuerpo incorporado en células bajo un microscopio de fluorescencia utilizando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo terapéutico (Cell Death and Differenceination (2008) 15, 751-761), (2) un ensayo para medir la intensidad de fluorescencia incorporada en células usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo terapéutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004), o (3) un ensayo Mab-ZAP usando una unión de inmunotoxina al anticuerpo terapéutico en el que la toxina se libera tras la incorporación a las células para inhibir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, enero de 2000).

Como inmunotoxina, se puede usar una proteína compleja recombinante de un dominio catalítico de toxina diftérica y proteína G.

En la presente invención, “alta capacidad de internalización” se refiere a la situación de que la tasa de supervivencia (que es una tasa relativa a la tasa de supervivencia celular sin la adición del anticuerpo como 100 %) de las células que expresan antígeno objetivo (por ejemplo, células que expresan CLDN6) con la adición del anticuerpo y un anticuerpo anti-ratón o de rata IgG marcado con saporina es preferiblemente del 70 % o menos, y más preferiblemente del 60 % o menos.

[0121]

Dado que el compuesto conjugado en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención ejerce un efecto antitumoral, se prefiere, pero no es esencial, que el propio anticuerpo tenga un efecto antitumoral. Con el fin de ejercer específica y selectivamente la citotoxicidad del compuesto antitumoral contra las células tumorales, es importante, y

también se prefiere, que el anticuerpo tenga la propiedad de internalizarse para migrar a las células tumorales. Para ejercer un efecto antitumoral, es importante, y también se prefiere, que el anticuerpo tenga la propiedad de internalizarse y migrar a las células tumorales, desde el punto de vista de que el fármaco dañe específica y selectivamente las células tumorales. La actividad antitumoral del anticuerpo se refiere a la actividad citotóxica celular o al efecto anticelular contra las células tumorales. La actividad antitumoral puede confirmarse utilizando cualquier sistema de evaluación in vitro o in vivo conocido.

Ejemplos de dicho anticuerpo pueden incluir, entre otros, anticuerpos a antígenos relacionados con tumores, que incluyen un anticuerpo anti-CLDN6, un anticuerpo anti-CLDN6/CLDN9, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-DLL3 (proteína 3 similar a la Delta), un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56 , un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD98, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-FGFR2 (por ejemplo, WO 201315206), un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1 (por ejemplo, WO 2011012309), un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anticuerpo anti-PSMA, un anticuerpo anti-tenascina-C, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-DR5.

El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo anti-CLDN6, un anticuerpo anti-CLDN6/CLDN9, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-CD98 o un anticuerpo anti-TROP2, y más preferiblemente un anticuerpo anti-CLDN6 o un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab, una variante del trastuzumab).

[0122]

El anticuerpo de la presente invención puede obtenerse usando un método llevado a cabo habitualmente en el arte, que implica inmunizar animales con un polipéptido antigénico y recolectar y purificar anticuerpos producidos in vivo. El origen del antígeno no se limita a los humanos, y los animales pueden inmunizarse con un antígeno derivado de un animal no humano, como un ratón, una rata o similares. En este caso, la reactividad cruzada de los anticuerpos que se unen al antígeno heterólogo obtenido con antígenos humanos puede analizarse para detectar un anticuerpo aplicable a una enfermedad humana.

Alternativamente, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra el antígeno se fusionan con células de mieloma de acuerdo con un método conocido en el arte (por ejemplo, Nature (1975) 256, páginas 495-497, Monoclonal Antibodies, páginas 365-367, Plenum Prensa, NY (1980)) para establecer hibridomas, a partir de las cuales se pueden obtener anticuerpos monoclonales (descritos más adelante).

El antígeno se puede obtener mediante la modificación genética de células huésped para producir un gen que codifique la proteína antigénica.

[0123]

El anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado de la presente invención se pueden obtener de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81, 6851-6855, (1984), Nature (1986) 321, páginas 522-525, WO 90/07861).

[0124]

El anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5.821.337), el anticuerpo anti-TROP2 (por ejemplo, WO 2003/074566) y el anticuerpo anti-CD98 (por ejemplo, WO 2015/146132) se pueden obtener utilizando un enfoque conocido.

[0125]

Ahora, se describirá el anticuerpo anti-CLDN6 usado en la presente invención. Una realización descrita a continuación es un ejemplo de realizaciones representativas de la presente invención, y en donde el alcance de la presente invención no se interpreta como disminuido por la realización.

[0126]

1. CLDN6 y CLDN9

CLDN6, una proteína de cuatro transmembranas que pertenece a la familia claudina y que consta de 220 aminoácidos, tiene el extremo N y el extremo C en una célula.

La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN para la CLDN6 humana se publican en bases de datos públicas y se pueden consultar, por ejemplo, a partir de los números de acceso de NP_067018 (SEQ ID NO: 1 (Figura 11)) y NM_021195 (SEQ ID NO: 2 (Figura 11) (ambos en NCBI).

En la secuencia de aminoácidos de la proteína CLDN6 humana (en adelante denominada “secuencia de aminoácidos CLDN6”), la región extracelular está compuesta por un dominio extracelular (EC1) que consiste en residuos de aminoácidos 29 a 81 de la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias y un dominio extracelular (EC2) que consiste en residuos de aminoácidos 138 a 160 de la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias.

CLDN9, una proteína de cuatro transmembranas que pertenece a la familia claudina y que consta de 217 aminoácidos, tiene el extremo N y el extremo C en una célula.

CLDN9 es altamente homólogo a CLDN6.

La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN para CLDN9 humana se publican en bases de datos públicas, y se pueden consultar, por ejemplo, a partir de los números de acceso de NP_066192 (SEQ ID NO: 3 (Figura 12)) y NM_020982 (SEQ ID NO: 4 (Figura 12)) (ambos en NCBI).

[0127]

2. Anticuerpo anti-CLDN6

Un ejemplo del anticuerpo anti-CLDN6 de la presente invención es un anticuerpo anti-CLDN6 que reconoce una estructura de orden superior que incluye dos regiones extracelulares, específicamente, una secuencia de aminoácidos de las posiciones 29 a 81 y la secuencia de aminoácidos de las posiciones 138 a 160 desde el extremo N de CLDN6 representado por la SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias, y tiene actividad de internalización.

El anticuerpo anti-CLDN6 de la presente invención es un anticuerpo capaz de dirigirse a células tumorales, y específicamente tiene una propiedad de reconocer una célula tumoral, una propiedad de unirse a una célula tumoral, una propiedad de incorporarse e internalizarse en una célula tumoral, y así. Por consiguiente, el anticuerpo anti-CLDN6 de acuerdo con la presente invención puede usarse para un fármaco inmunoconjugado al conjugarse a través de un enlazador con un compuesto que tiene actividad antitumoral.

El anticuerpo anti-CLDN6 de la presente invención puede tener actividad antitumoral.

[0128]

El anticuerpo anti-CLDN6 se puede obtener usando un método que generalmente se lleva a cabo en el arte, que implica inmunizar animales con un polipéptido antigénico y recolectar y purificar anticuerpos producidos in vivo. CLDN6 es una proteína de cuatro transmembranas y, por lo tanto, la proteína que retiene la estructura tridimensional puede usarse como antígeno, y ejemplos de tales métodos pueden incluir, entre otros, inmunización celular.

Alternativamente, las células productoras de anticuerpos que producen anticuerpos contra el antígeno se fusionan con células de mieloma de acuerdo con el método conocido en el arte para establecer hibridomas, a partir de las cuales se pueden obtener anticuerpos monoclonales.

[0129]

Ahora, se describirá específicamente un método para obtener un anticuerpo contra CLDN6.

1) Preparación de antígeno

CLDN6 puede purificarse directamente para su uso a partir de tejido tumoral o células tumorales de un humano, o se puede preparar una fracción de membrana celular de las células para su uso como CLDN6. Alternativamente, CLDN6 puede obtenerse al sintetizar CLDN6 in vitro (por ejemplo, sistema de traducción rápida (RTS) producido por Roche Diagnostics K.K.), o permitiendo que las células huésped produzcan CLDN6 mediante modificación genética.

Para obtener el antígeno a través de la modificación genética, el ADNc para CLDN6 se incorpora en un vector capaz de expresar el ADNc y se sintetiza CLDN6 en una solución

que contiene una enzima, un sustrato y una sustancia energética necesaria para la transcripción y traducción, o las células huésped de otra procariota o eucariota se transforman para permitir que las células expresen CLDN6. Alternativamente, las células que expresan CLDN6 obtenidas a través de la modificación genética o una línea celular que expresa CLDN6 pueden usarse como proteína CLDN6.

El antígeno se puede obtener como una proteína secretora al permitir que un sistema vector-hospedador apropiado exprese una proteína de fusión que incluye la región extracelular de la proteína de membrana CLDN6 y la región constante de un anticuerpo unido entre sí.

El transformante descrito anteriormente en sí mismo puede usarse como antígeno.

Además, una línea celular que expresa CLDN6 puede usarse como antígeno. Ejemplos de tales líneas celulares pueden incluir células de la línea celular humana de cáncer de páncreas NOR-P1; las líneas celulares humanas de cáncer de ovario NIH: OVCAR-3, OV-90 y OAW28; la línea celular humana de teratoma ovárico PA-1; la línea celular humana de cáncer de hígado HuH-7; la línea celular humana de coriocarcinoma gastacional JEG-3; y la línea celular humana de carcinoma embrionario pluripotente NTERA-2 clon D1, pero no están limitadas a las mismas y cualquier línea celular que exprese CLDN6 es aceptable.

La proteína CLDN9 que se va a utilizar en la presente invención se puede preparar para usarse de la misma manera.

2) Producción del anticuerpo monoclonal anti-CLDN6

El anticuerpo anti-CLDN6 usado en la presente invención no está limitado a un anticuerpo particular y, por ejemplo, se puede usar preferiblemente un anticuerpo especificado por cualquiera de las secuencias de aminoácidos enumeradas en el presente Listado de Secuencias. Se desea que el anticuerpo anti-CLDN6 que se va a utilizar en la presente invención tenga las siguientes propiedades.

(1) Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades (a) y (b).

(a) reconoce o se une a la familia CLDN.

El anticuerpo de la presente invención reconoce la familia CLDN. En otras palabras, el anticuerpo de la presente invención se une a la familia CLDN. El anticuerpo de la presente invención se une preferiblemente a CLDN6, y más preferiblemente se une específicamente a CLDN6. Además, el anticuerpo de la presente invención puede reconocer CLDN9 o unirse a CLDN9.

En la presente invención, “reconocimiento específico”, es decir, “unión específica” se refiere a que la unión no es adsorción inespecífica. Ejemplos de criterios de determinación sobre si la unión es específica o no pueden incluir, entre otros, constantes de disociación (en lo sucesivo, “KD”). Un valor de KD preferido del anticuerpo de la presente

invención para CLDN6 y/o CLDN9 es 1 x $10^{-5}$ M o menos, 5 x $10^{-6}$ M o menos, 2 x $10^{-6}$ M o menos, o 1 x $10^{-6}$ M o menos, y más preferiblemente 5 x $10^{-7}$ M o menos, 2 x $10^{-7}$ M o menos, o 1 x $10^{-7}$ M o menos.

La unión entre un antígeno y un anticuerpo en la presente invención puede medirse o determinarse mediante un método de análisis tal como un método ELISA, un método RIA y resonancia de plasmón superficial (en lo sucesivo, "SPR"). La unión entre un antígeno expresado en una superficie celular y un anticuerpo puede medirse, por ejemplo, mediante un método de citometría de flujo.

(b) tiene actividad para internalizarse en células que expresan CLDN6 y/o CLDN9 a través de la unión a CLDN6 y/o CLDN9.

(2) El anticuerpo según (1), en donde CLDN6 y/o CLDN9 son/es CLDN6 humana y/o CLDN9 humana.

[0130]

Con el fin de obtener el anticuerpo contra CLDN6, el método de la presente invención implica normalmente los siguientes pasos, pero no se limita a lo siguiente. (Método usando hibridoma)

(a) Purificación de un biopolímero para su uso como antígeno o preparación de células que expresan antígeno, y administración del biopolímero o células que expresan antígeno a un animal;

(b) recolección de tejido (por ejemplo, un ganglio linfático) que incluye células productoras de anticuerpos del animal para el que se ha inducido la inmunorreacción;

(c) preparación de células de mieloma (por ejemplo, células de mieloma de ratón SP2/0-ag14);

(d) fusión celular de células productoras de anticuerpos y células de mieloma;

(e) selección de un grupo de hibridoma que produce el anticuerpo objetivo;

(f) división en clones unicelulares (clonación);

(g) un paso opcional de cultivo del hibridoma para la producción en masa de un anticuerpo monoclonal o la cría de un animal al que se trasplantó el hibridoma; y

(h) examinación de la actividad fisiológica (actividad de internalización) y la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal así producido, o prueba de propiedades como reactivo de marcado.

Ejemplos de métodos que se van a utilizar aquí para medir títulos de anticuerpos pueden incluir, entre otros, citometría de flujo y un método Cell-ELISA.

[0131]

Ejemplos del anticuerpo monoclonal anti-CLDN6 así obtenido pueden incluir, entre otros, los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón B1 y C7. En la presente invención, el

“B1” y el “C7” se denominan ocasionalmente como el “anticuerpo B1” y el “anticuerpo C7”, respectivamente.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo B1 están representadas respectivamente por la SEQ ID NO: 20 (Figura 19) y SEQ ID NO: 21 (Figura 19) en el Listado de Secuencias. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo B1 están representadas respectivamente por la SEQ ID NO: 18 (Figura 18) y SEQ ID NO: 19 (Figura 18) en el Listado de Secuencias.

Las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del anticuerpo B1 están representadas por la SEQ ID NO: 9 (Figura 15), SEQ ID NO: 10 (Figura 15), SEQ ID NO: 11 (Figura 15), SEQ ID NO: 5 (Figura 13), SEQ ID NO: 6 (Figura 13), y SEQ ID NO: 7 (Figura 13), respectivamente.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo C7 están representadas respectivamente por la SEQ ID NO: 24 (Figura 21) y SEQ ID NO: 25 (Figura 21) en el Listado de Secuencias. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo C7 están representadas respectivamente por la SEQ ID NO: 22 (Figura 20) y SEQ ID NO: 23 (Figura 20) en el Listado de Secuencias.

Las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del anticuerpo C7 están representadas por la SEQ ID NO: 15 (Figura 17), SEQ ID NO: 16 (Figura 17), SEQ ID NO: 17 (Figura 17), SEQ ID NO: 12 (Figura 16), SEQ ID NO: 13 (Figura 16), y SEQ ID NO: 14 (Figura 16), respectivamente.

[0132]

Además, incluso si un anticuerpo monoclonal se obtuvo nuevamente de forma independiente mediante los pasos (a) a (h) en la “producción del anticuerpo anti-CLDN6”, o si un anticuerpo monoclonal se obtuvo por separado usando otro método, se puede obtener un anticuerpo que tiene una actividad de internalización equivalente a la del anticuerpo B1 o anticuerpo C7. Un ejemplo de tales anticuerpos es un anticuerpo que se une a un epítopo para el anticuerpo B1 o anticuerpo C7. Si un anticuerpo monoclonal recién producido se une a un péptido parcial o estructura tridimensional parcial a la que se une el anticuerpo B1 o el anticuerpo C7, se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une a un epítopo para el anticuerpo B1 o anticuerpo C7. Al confirmar que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo B1 o anticuerpo C7 para unirse al CLDN6 (es decir, el anticuerpo monoclonal interfiere con la unión entre el anticuerpo B1 o anticuerpo C7 y CLDN6), se puede determinar, incluso cuando la secuencia o estructura específica de un epítopo no se ha determinado, que el anticuerpo monoclonal se une a un epítopo para el anticuerpo anti-CLDN6. Si se ha confirmado la identidad del epítopo, se espera que el

anticuerpo monoclonal tenga una capacidad de unión a antígeno, una actividad biológica y/o una actividad de internalización equivalente a la del anticuerpo B1 o anticuerpo C7. [0133]

El anticuerpo de la presente invención incluye, además del anticuerpo monoclonal contra CLDN6, un anticuerpo recombinante génico obtenido por modificación artificial con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga para humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos se pueden producir utilizando un método conocido.

(1) Anticuerpo quimérico

Ejemplos del anticuerpo quimérico pueden incluir, entre otros, un anticuerpo en el que las regiones variables y constantes del anticuerpo se derivan de diferentes especies, por ejemplo, un anticuerpo quimérico en el que una región variable del anticuerpo derivado de ratón o rata está conectada a un región constante de anticuerpos derivados de humanos (véase Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 81, 6851-6855, (1984)).

Un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-humano CLDN6 B1 de ratón, como un ejemplo del anticuerpo quimérico de la presente invención, es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 (Figura 19) y una cadena liviana que comprende una región variable de la cadena liviana representada por la SEQ ID NO: 19 (Figura 18), que puede comprender cualquier región constante derivada del ser humano.

Ejemplos específicos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-humano CLDN6 B1 de ratón pueden incluir, entre otros, el anticuerpo quimérico chB1, anticuerpo (en lo sucesivo, también denominado “chB1”) derivado del anticuerpo anti-humano CLDN6 B1 de ratón. Ejemplos del anticuerpo chB1, en términos de la secuencia de aminoácidos, pueden incluir, entre otros, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 32 (Figura 24) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 28 (Figura 22) en el Listado de Secuencias.

En la secuencia de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 32 (Figura 24) en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 1 a 19 es la secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 141 es la región variable de la cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 142 a 471 es la región constante de la cadena pesada. En la secuencia de la cadena liviana representada por la SEQ ID NO: 28 (Figura 22) en el Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en

residuos de aminoácidos 1 a 20 es la secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 127 es la región variable de la cadena liviana y la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 128 a 234 es la región constante de la cadena liviana.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y cadena liviana del anticuerpo chB1 están representadas respectivamente por la SEQ ID NO: 34 (Figura 25) y SEQ ID NO: 30 (Figura 23) en el Listado de Secuencias.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo chB1 está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 33 (Figura 24) en el Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 1 a 57 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 33 en el Listado de Secuencias codifica la secuencia de señal de la cadena pesada del anticuerpo chB1, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 58 a 423 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 33 en el Listado de Secuencias codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo chB1, y una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 424 a 1413 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 33 en el Listado de Secuencias codifica la región constante de la cadena pesada del anticuerpo chB1.

La secuencia de nucleótidos para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo chB1 está representada por la SEQ ID NO: 35 (Figura 25) en el Listado de Secuencias.

La secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo chB1 está codificada por una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 29 (Figura 22) en el Listado de Secuencias. Una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 26 a 85 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 29 en el Listado de Secuencias codifica la secuencia de señal de la cadena liviana del anticuerpo chB1, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 86 a 406 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 29 en el Listado de Secuencias codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo chB1, y una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 407 a 727 de una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 29 en el Listado de Secuencias codifica la región constante de la cadena liviana del anticuerpo chB1.

La secuencia de nucleótidos para la región variable de la cadena liviana del anticuerpo chB1 está representada por la SEQ ID NO: 31 (Figura 23) en el Listado de Secuencias.

(2) Anticuerpo humanizado

Ejemplos del anticuerpo humanizado pueden incluir, entre otros, un anticuerpo obtenido al incorporar solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado del ser humano (véase Nature (1986) 321, páginas 522-525), un anticuerpo obtenido al injertar una parte de los residuos de aminoácidos de un marco, así como las secuencias de CDR a un anticuerpo humano mediante un método de injerto de CDR (WO 90/07861), y un anticuerpo en el que se ha modificado una parte de las secuencias de aminoácidos de CDR con la capacidad de unión a un antígeno mantenido.

Sin embargo, si el anticuerpo humanizado se deriva del anticuerpo B1 o anticuerpo C1, el anticuerpo humanizado puede ser cualquier anticuerpo humanizado, sin limitarse a un anticuerpo humanizado particular, que retiene todas las seis secuencias de CDR del anticuerpo B1 o anticuerpo C1 y tiene actividad de unión a CLDN6, y además el anticuerpo humanizado puede ser cualquier anticuerpo humanizado, sin limitarse a un anticuerpo humanizado particular, de modo que su variante del anticuerpo humanizado en el que una a varias (preferiblemente, una o dos, más preferiblemente, una) secuencias de aminoácidos de CDR se han modificado también reconoce la proteína CLDN6, o tiene la actividad de unión a la proteína CLDN6 del anticuerpo original.

Ejemplos del anticuerpo anti-CLDN6 humanizado de la presente invención o un fragmento funcional del mismo pueden incluir, entre otros, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una región variable que comprende:

CDRH1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 (Figura 15) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente;

CDRH2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10 (Figura 15) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente; y

CDRH3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11 (Figura 15) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente; y

una cadena liviana que tiene una región variable que comprende:

CDRL1 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 (Figura 13) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente;

CDRL2 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 (Figura 13) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente; y

CDRL3 que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 (Figura 13) en el Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos obtenida al sustituir uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en el aminoácido mencionado anteriormente; y

reconocer la proteína CLDN6 de la presente invención o retener la actividad de unión a la proteína CLDN6 del anticuerpo,
o un fragmento funcional del anticuerpo.

Ejemplos preferidos de sustitución de aminoácidos de CDR en el anticuerpo anti-CLDN6 humanizado o fragmento funcional del mismo pueden incluir, entre otros, la sustitución de uno a varios (preferiblemente, uno o dos) aminoácidos en CDRL3 como se describió anteriormente, y un ejemplo de los mismos es CDRL3 representado por la SEQ ID NO: 8 (Figura 14) en el Listado de Secuencias, que se obtiene al sustituir residuos de aminoácidos 4 y 5 de la SEQ ID NO: 7 en el Listado de Secuencias.

[0134]

Ejemplos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado que comprende las CDRH descritas anteriormente pueden incluir, entre otros, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 (Figura 35) en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 (Figura 37) en el Listado de Secuencias, y una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62 (Figura 39) en el Listado de Secuencias, y ejemplos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado que componen los CDRL descritos anteriormente pueden incluir, entre otros, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38 (Figura 27) en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42 (Figura 29) en el Listado de Secuencias, y una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46 (Figura 31) en el Listado de Secuencias.

[0135]

Ejemplos preferidos de anticuerpos humanizados que incluyen una combinación de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana anteriores pueden incluir, entre otros:

un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 (Figura 35) en el Listado de Secuencias y una región variable de la cadena liviana que consiste en

una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38 (Figura 27) en el Listado de Secuencias;

un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 (Figura 37) en el Listado de Secuencias y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42 (Figura 29) en el Listado de Secuencias;

un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 54 (Figura 35) en el Listado de Secuencias y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46 (Figura 31) en el Listado de Secuencias;

un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 (Figura 37) en el Listado de Secuencias y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 50 (Figura 33) en el Listado de Secuencias; y

un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62 (Figura 39) en el Listado de Secuencias y una región variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 46 (Figura 31) en el Listado de Secuencias.

[0136]

Ejemplos de secuencias de longitud completa de anticuerpos humanizados que incluyen una combinación de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana anteriores pueden incluir, entre otros:

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 (Figura 34) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 36 (Figura 26) en el Listado de Secuencias (H1L1);

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 (Figura 36) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 40 (Figura 28) en el Listado de Secuencias (H2L2);

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 52 (Figura 34) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44 (Figura 30) en el Listado de Secuencias (H1L3);

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 56 (Figura 36) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 48 (Figura 32) en el Listado de Secuencias (H2L4); y

un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 471 de la SEQ ID NO: 60 (Figura 38) en el Listado de Secuencias y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 44 (Figura 30) en el Listado de Secuencias (H3L3).

En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 52 (Figura 34), 56 (Figura 36), o 60 (Figura 38) en el Listado de Secuencias, una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 1 a 19 es la secuencia de señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 141 es la región variable de la cadena pesada y una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 142 a 471 es la región constante de la cadena pesada.

En la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana representada por la SEQ ID NO: 36 (Figura 26), 40 (Figura 28), 44 (Figura 30), o 48 (Figura 32), una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 1 a 20 es la secuencia de señal, una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 127 es la región variable de la cadena liviana y una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 128 a 234 es la región constante de la cadena liviana.

[0137]

La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H1L1 y que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H1L1 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 53 (Figura 34) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 37 (Figura 26), respectivamente;

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H2L2 y que codifica la secuencia aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H2L2 son un polinucleótido representado por la

SEQ ID NO: 57 (Figura 36) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 41 (Figura 28), respectivamente;

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H1L3 y que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H1L3 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 53 (Figura 34) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 45 (Figura 30), respectivamente;

las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H2L4 y que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H2L4 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 57 (Figura 36) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 49 (Figura 32), respectivamente; y

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H3L3 y que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H3L3 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 61 (Figura 38) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 45 (Figura 30), respectivamente.

La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H1L1 y que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H1L1 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 55 (Figura 35) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 39 (Figura 27), respectivamente;

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H2L2 y que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H2L2 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 59 (Figura 37) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 43 (Figura 29), respectivamente;

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H1L3 y que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H1L3 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 55 (Figura 35) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 47 (Figura 31), respectivamente;

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H2L4 y que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H2L4 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 59 (Figura 37) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 51 (Figura 33), respectivamente; y

la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado H3L3 y que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado H3L3 son un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 63 (Figura 39) y un polinucleótido representado por la SEQ ID NO: 47 (Figura 31), respectivamente.

En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 53 (Figura 34), 57 (Figura 36) o 61 (Figura 38) en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 1 a 57 codifica la secuencia de señal de la cadena pesada del anticuerpo humanizado, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos nucleótidos 58 a 423 codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado, y una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 424 a 1413 codifica la región constante de la cadena pesada del anticuerpo.

En la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 37 (Figura 26), 41 (Figura 28), 45 (Figura 30) o 49 (Figura 32) en el Listado de Secuencias, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 1 a 60 codifica la secuencia de señal de la cadena liviana del anticuerpo humanizado, una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 61 a 381 codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo humanizado, y una secuencia de nucleótidos que consiste en residuos de nucleótidos 382 a 702 codifica la región constante de la cadena liviana del anticuerpo.

[0138]

Siempre que tenga actividad de unión a CLDN6, cualquier anticuerpo que tenga una identidad u homología del 80 % o más, preferiblemente del 90 % o más, más preferiblemente del 95 % o más, incluso más preferiblemente del 97 % o más, lo más preferible del 99 % o más, a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos, incluidas las combinaciones anteriores de una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana y los anticuerpos que incluyen las combinaciones anteriores de una cadena pesada y una cadena liviana se incluye también en el anticuerpo de la presente invención.

Siempre que tenga actividad de unión a CLDN6, cualquier anticuerpo que incluya CDR que consista en las secuencias de aminoácidos de las CDR de cualquiera de los anticuerpos, incluidas las combinaciones anteriores de una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana y los anticuerpos que incluyen las combinaciones anteriores de una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que excluye las secuencias de aminoácidos de las CDR tiene una identidad u homología de aminoácidos del 80 % o más, preferiblemente del 90 % o

más, más preferiblemente de 95 % o más, incluso más preferiblemente de 97 % o más, lo más preferible del 99 % o más, se incluye también en el anticuerpo de la presente invención.

Además, un anticuerpo que tiene una actividad biológica equivalente a cada uno de los anticuerpos anteriores se puede seleccionar mediante la combinación de secuencias de aminoácidos obtenidas al sustituir, eliminar o añadir uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena liviana. La sustitución de un aminoácido en el presente documento es preferiblemente una sustitución conservadora de aminoácidos (documento WO 2013154206).

La sustitución conservadora de aminoácidos es la sustitución que ocurre en un grupo de aminoácidos con cadenas laterales de aminoácidos relacionadas. Dicha sustitución de aminoácidos es preferiblemente llevada a cabo de tal manera que las propiedades de la sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos original no disminuyen.

La homología entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar con el uso de parámetros predeterminados del algoritmo Blast versión 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L.Madden, Alejandro A. Schaaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J.Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) Blast algorithm may be used by accessing www.ncbi.nlm.nih.gov/blast on the Internet.

(3) Anticuerpo humano

Otros ejemplos del anticuerpo de la presente invención pueden incluir, entre otros, anticuerpos humanos capaces de unirse a CLDN6 y/o CLDN9. El anticuerpo humano anti-CLDN6 y/o CLDN9 se refiere a un anticuerpo humano que tiene solo una secuencia del gen del anticuerpo derivada de un cromosoma humano. El anticuerpo anti-CLDN6 humano puede obtenerse usando un método con un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento de cromosoma humano que incluye los genes de una cadena pesada y liviana de un anticuerpo humano (véase Nature Genetics (1997) 16, páginas 133-143; Nucl. Acids Res. (1998) 26, páginas 3447-3448; Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, páginas 69-73, Kluwer Academic Publishers, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (2000) 97, páginas 722-727, etc.).

Específicamente, dicho ratón productor de anticuerpos humanos puede crearse al producir un animal *knockout* o animal transgénico como un animal recombinante genético con los locus genéticos para la cadena pesada y la cadena liviana de la inmunoglobulina endógena destruida, en cambio, con los locus genéticos para la cadena pesada y cadena liviana de la inmunoglobulina humana introducida en los mismos, por ejemplo, a través de un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) y cruzamiento de tales animales.

Alternativamente, dicho anticuerpo puede obtenerse de la siguiente manera: se transforma una célula eucariota con ADNc que codifica la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo humano, preferiblemente con un vector que incluye el ADNc, a través de una técnica recombinante de genes, y se cultiva la célula transformada que produce un anticuerpo monoclonal humano de gen recombinante, y se obtiene el anticuerpo del sobrenadante del cultivo.

Para el huésped, por ejemplo, se puede usar una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero tal como una célula CHO, un linfocito y una célula de mieloma.

Además, se conoce un método para obtener un anticuerpo humano derivado del despliegue en fagos clasificado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Investigative Ophthalmology & Visual Science (2002) 43 (7), páginas 2301-2308; Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), páginas 189-203; Ophthalmology (2002) 109 (3), páginas 427-431, etc.).

Por ejemplo, se puede utilizar un método de despliegue en fagos (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), páginas 1105-1116), en el que la región variable de un anticuerpo humano se expresa como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en las superficies de los fagos, y se seleccionan los fagos que se unen al antígeno.

El análisis de genes de fagos seleccionados debido a la unión al antígeno puede determinar la secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno.

Una vez se clarifica la secuencia de ADN de scFv que se une al antígeno, se puede obtener el anticuerpo humano al producir un vector de expresión que incluye la secuencia y al introducir el vector de expresión en un huésped apropiado para la expresión (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, páginas 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), páginas 1105-1116).

[0139]

Los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos humanos, etc., que se obtienen mediante el uso del método anterior pueden evaluarse para determinar la actividad de unión a un antígeno, por ejemplo, mediante el uso de un método conocido para detectar un anticuerpo preferido.

Otro ejemplo de indicadores en la comparación de características entre anticuerpos es la estabilidad de los anticuerpos. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un aparato capaz de medir de forma rápida y precisa los puntos medios de desnaturalización térmica (Tm), un buen indicador de la estabilidad estructural relativa de la proteína.

La diferencia en la estabilidad térmica se puede comparar mediante la comparación de los valores de Tm medidos con DSC. Se sabe que la estabilidad de almacenamiento de

los anticuerpos está correlacionada con la estabilidad térmica de los anticuerpos en cierto grado (Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, páginas 265-273), y por lo tanto, la estabilidad térmica puede usarse como un indicador para detectar un anticuerpo preferido. Ejemplos de otros indicadores para la detección de un anticuerpo pueden incluir, entre otros, un alto rendimiento en células huésped apropiadas y una baja propiedad de aglutinación en solución acuosa. Es necesario detectar el anticuerpo más adecuado para la administración a humanos a través de una determinación exhaustiva con base en los indicadores descritos anteriormente, dado que, por ejemplo, un anticuerpo con el mayor rendimiento no necesariamente exhibe la mayor estabilidad térmica.

[0140]

El anticuerpo de la presente invención incluye “anticuerpos que se unen a un sitio al que se une el anticuerpo anti-CLDN6 proporcionado por la presente invención”. Es decir, la presente invención incluye anticuerpos que se unen a un sitio en la proteína CLDN6 que es reconocido por B1 o C7 de la presente invención.

[0141]

El anticuerpo de la presente invención incluye variantes modificadas del anticuerpo. La variante modificada se refiere a una variante obtenida al someter el anticuerpo de la presente invención a modificación química o biológica. Ejemplos de la variante modificada químicamente pueden incluir, entre otros, variantes que incluyen un enlace de una fracción química a un esqueleto de aminoácidos y variantes con modificación química de una cadena de carbohidrato unida a N o unida a O. Ejemplos de la variante biológicamente modificada pueden incluir, entre otros, variantes obtenidas por modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación unida a N o unida a O, procesamiento de extremos N o C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina) y variantes en las que se ha agregado un residuo de metionina al extremo N al expresarse en una célula huésped procariota. Además, en el significado de la variante modificada, se incluye también un anticuerpo marcado para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo de la presente invención o un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzima, un anticuerpo marcado con fluorescencia y un anticuerpo marcado con afinidad.

Tal variante modificada del anticuerpo de la presente invención es útil para mejorar la estabilidad y retención de sangre del anticuerpo, reducir la antigenicidad del mismo, detectar o aislar un anticuerpo o un antígeno, y así sucesivamente.

Además, al regular la modificación de un glicano que está unido al anticuerpo de la presente invención (glicosilación, defucosilación, etc.), se puede potenciar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo. Como la técnica para regular la modificación de un glicano de anticuerpos, se conocen los documentos WO 1999/54342, WO 2000/61739, WO 2002/31140, etc. Sin embargo, la técnica no está limitada a las mismas.

En el anticuerpo de la presente invención, también se incluyen anticuerpos en los que se regula la modificación de un glicano.

Dicha modificación puede aplicarse en cualquier posición o en una posición deseada en un anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo, y el mismo tipo o dos o más tipos diferentes de modificación pueden aplicarse en una o dos o más posiciones.

En la presente invención, el significado de una "variante modificada de un fragmento de anticuerpo" también incluye un "fragmento de una variante modificada de un anticuerpo".

[0142]

Si un gen del anticuerpo se aísla temporalmente y luego se introduce en un huésped apropiado para producir un anticuerpo, se puede usar una combinación apropiada de un huésped y un vector de expresión. Ejemplos específicos del gen del anticuerpo pueden incluir, entre otros, la combinación de un gen que codifica la secuencia de la cadena pesada o similar de un anticuerpo descrito aquí y un gen que codifica la secuencia de la cadena liviana o similar de un anticuerpo descrito aquí. Para transformar las células huésped, un gen de secuencia de cadena pesada o similar y un gen de secuencia de cadena liviana o similar pueden insertarse en el mismo vector de expresión, o insertarse en vectores de expresión separados.

Si se usan células eucariotas como huésped, se pueden usar células animales, células vegetales y microorganismos eucariotas. Particularmente, ejemplos de células animales pueden incluir, entre otros, células de mamíferos, tales como células COS (Cell (1981) 23, páginas 175-182, ATCC CRL-1650), como células de mono, el fibroblasto de ratón NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), una cepa deficiente en dihidrofolato reductasa (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, página
4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC CCL-61) y células FreeStyle 293F (Invitrogen).

Si se usan células procariotas, por ejemplo, se puede usar *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*.

Se introduce un gen del anticuerpo objetivo en estas células mediante transformación y las células transformadas se cultivan in vitro para proporcionar un anticuerpo. La diferencia de secuencia entre los anticuerpos puede dar como resultado diferentes rendimientos en el cultivo y, por lo tanto, los anticuerpos que permiten la fácil producción de un medicamento pueden seleccionarse de anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente al usar los rendimientos como indicador. Por consiguiente, el anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos obtenidos con el uso de un método para producir el anticuerpo, el método incluye los pasos de: cultivar la célula

huésped transformada; y recolectar un anticuerpo objetivo o un fragmento funcional del anticuerpo de un cultivo obtenido en la etapa de cultivo.

[0143]

El gen del anticuerpo es preferiblemente un polinucleótido que incluye un polinucleótido descrito en uno cualquiera de (a) a (e):

(a) una combinación de un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de un anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos B1 o C7, el anticuerpo chB1 y los anticuerpos humanizados H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3;

(b) una combinación de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que incluye las secuencias de CDRH1 a CDRH3 y un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que incluye las secuencias de CDRL1 a CDRL3 de un anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos B1 o C7, el anticuerpo chB1 y los anticuerpos humanizados H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3;

(c) una combinación de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de un anticuerpo de cualquiera del anticuerpo B1 o C7, el anticuerpo chB1 y los anticuerpos humanizados H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3;

(d) un polinucleótido que se puede hibridar con nucleótidos que consiste en un polinucleótido complementario al polinucleótido según cualquiera de (a) a (c) en condiciones estrictas y está codificando la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo capaz de unirse a CDLN6; y

(e) un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido obtenido al sustituir, eliminar, añadir o insertar 1 a 50, 1 a 45, 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, uno a ocho, uno a seis, uno a cinco, uno a cuatro, uno a tres, uno o dos, o uno o más aminoácidos en el polinucleótido según cualquiera de (a) a ( c), y está codificando la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo capaz de unirse a CDLN6.

La presente invención incluye un nucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención o un fragmento funcional del anticuerpo, o una variante modificada del anticuerpo o fragmento funcional; un vector recombinante que incluye el gen insertado en el mismo; y una célula que incluye el gen o el vector introducido en el mismo.

La presente invención incluye un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, o una variante modificada del anticuerpo o fragmento funcional, el método incluye los pasos de: cultivar la célula; y recolectar del cultivo un

anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo, o una variante modificada del anticuerpo o fragmento funcional.

[0144]

Se sabe que se elimina un residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también se sabe que se eliminan dos residuos de aminoácidos, glicina y lisina, en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en una célula de mamífero cultivada y que se amida un residuo de prolina recién ubicado en el extremo carboxilo (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha deleción y modificación de la secuencia de la cadena pesada no afecta la capacidad de unión al antígeno y la función efectora (la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) del anticuerpo.

Por lo tanto, en el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, también se incluyen anticuerpos sometidos a dicha modificación y fragmentos funcionales del anticuerpo, y variantes de deleción en las que se han eliminado uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, variantes obtenidas mediante la amidación de variantes de deleción (por ejemplo, una cadena pesada en la que se ha amidado el residuo de prolina del extreme carboxilo) y similares. El tipo de variantes de deleción que tienen una deleción en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no se limita a las variantes anteriores siempre que se conserve la capacidad de unión al antígeno y la función efectora. Las dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser de un tipo seleccionado del grupo que consiste en una cadena pesada de longitud completa y la variante de deleción descrita anteriormente, o pueden ser de dos tipos en combinación seleccionados de las mismas. La proporción de la cantidad de cada variante de deleción puede verse afectada por el tipo de células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y las condiciones de cultivo; sin embargo, un anticuerpo en el que se ha eliminado un residuo de aminoácido en el extremo carboxilo en las dos cadenas pesadas en el anticuerpo según la presente invención puede ejemplificarse preferiblemente como un componente principal de las moléculas del anticuerpo.

[0145]

Ejemplos de isotipos del anticuerpo anti-CLDN6 de la presente invención pueden incluir, entre otros, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), y ejemplos preferidos de los mismos incluyen IgG1, IgG2 e IgG4.

Si se usa IgG1 como el isotipo del anticuerpo de la presente invención, la función efectora puede ajustarse al sustituir algunos residuos de aminoácidos en la región constante.

Ejemplos de variantes de IgG1 con la función efectora reducida o atenuada pueden incluir, entre otros, IgG1 LALA (IgG1-L234A, L235A) e IgG1 LAGA (IgG1-L235A, G237A), y una variante preferida de IgG1 es IgG1 LALA. El L234A, L235A indica la sustitución de leucina con alanina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice de la UE (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., Vol. 63, No. 1 (15 de mayo de 1969), páginas 78-85), y el G237A indica la sustitución de glicina con alanina en la posición 237 especificada por la numeración del índice de la UE.

[0146]

Ejemplos comunes de bioactividad de anticuerpos pueden incluir, entre otros, actividad de unión a antígeno, actividad para internalizarse en células que expresan un antígeno mediante unión al antígeno, actividad para neutralizar actividad de antígeno, actividad para potenciar actividad de antígeno, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), y la función del anticuerpo según la presente invención es la actividad de unión a CLDN6, y preferiblemente la actividad para internalizar en células de expresión de CLDN6 al unirse a CLDN6. Además de la actividad de internalización celular, el anticuerpo de la presente invención puede tener actividades de ADCC, CDC y/o ADCP en combinación.

[0147]

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta un estado homogéneo. Para la separación/purificación del anticuerpo, se pueden usar métodos de separación/purificación comúnmente utilizados para proteínas. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse/purificarse al seleccionar y combinar apropiadamente la cromatografía en columna, la filtración por filtro, la ultrafiltración, la precipitación salina, la diálisis, la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, enfoque isoeléctrico, etc. (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero los métodos de separación/purificación no están limitados a los mismos.

Ejemplos de cromatografía pueden incluir, entre otros, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción.

Estas cromatografías pueden llevarse a cabo usando cromatografía líquida tal como HPLC y FPLC.

Ejemplos de columnas para cromatografía de afinidad pueden incluir, entre otros, una columna de proteína A y una columna de proteína G.

Alternativamente, el anticuerpo puede purificarse con el uso de actividad de unión a un antígeno con un vehículo en el que el antígeno ha sido inmovilizado.

[0148]

Es deseable que el anticuerpo anti-HER2 de la presente invención sea, por ejemplo, el que tenga cualquiera de las siguientes propiedades, pero el anticuerpo anti-HER2 no esté limitado a las mismas.

(1) Un anticuerpo anti-HER2 que tiene las siguientes propiedades:

(a) unión específica a HER2; e

(b) internalización en células que expresan HER2 al unirse a HER2.

(2) El anticuerpo según (1), que se une al dominio extracelular de HER2.

(3) El anticuerpo según (1) o (2), que es un anticuerpo monoclonal.

(4) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), que tiene actividades o actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC).

(5) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal quimérico o un anticuerpo monoclonal humanizado.

(6) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (3), en donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, y comprende una mutación que provoca la disminución de actividades o actividad de ADCC y/o CDC.

(7) El anticuerpo según (6), en donde la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, y la leucina en las posiciones 234 y 235 especificadas por la numeración del índice de la UE se sustituye con alanina.

(8) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (4), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 65 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 64.

(9) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (3), (6) y (7), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 469 de la SEQ ID NO: 75 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 73.

(10) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (9), en donde uno o dos aminoácidos se eliminan en el extremo carboxilo de una cadena pesada.

(11) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (3), (8) y (10), que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 1 a 449 de la SEQ ID NO: 65 y una cadena liviana que consiste en una

secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 1 a 214 de la SEQ ID NO: 64.
(12) El anticuerpo según cualquiera de (1) a (3), (6), (7), (9) y (10), que comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 20 a 468 de la SEQ ID NO: 75 y una cadena liviana que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos 21 a 234 de la SEQ ID NO: 73.
(13) Un anticuerpo obtenido mediante el uso de un método para producir el anticuerpo según cualquiera de (1) a (12), el método incluye los pasos de: cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo; y recolectar el anticuerpo objetivo de un cultivo obtenido de la etapa de cultivo.
[0149]
<Remodelación de glicanos>

Recientemente se ha informado de un método para remodelar la glucoproteína heterogénea de un anticuerpo por reacción enzimática o similar para introducir homogéneamente un glicano que tiene un grupo funcional (ACS Chemical Biology 2012, 7, 110, ACS Medicinal Chemistry Letters 2016, 7, 1005). Se ha hecho un intento con el uso de esta técnica de remodelación de glicano para introducir un fármaco específicamente en el sitio para sintetizar un ADC homogéneo (Bioconjugate Chemistry 2015, 26, 2233, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367, US 2016361436).
[0150]

En la remodelación de glicanos de la presente invención, usando hidrolasa, los glicanos heterogéneos añadidos a una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) se escinden para dejar solo GlcNAc en cada extremo, produciendo así una fracción de proteína homogénea con GlcNAc (en adelante denominado “aceptador”). Posteriormente, se proporciona un glicano arbitrario preparado por separado (en adelante denominado “donante”), y el aceptor y el donante se unen mediante el uso de transglucosidasa. De este modo, se puede sintetizar una glucoproteína homogénea con estructura de glicano arbitrario.
[0151]

En la presente invención, un “glicano” se refiere a una unidad estructural de dos o más monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos. Los monosacáridos y glicanos específicos se abrevian ocasionalmente, por ejemplo, como “GlcNAc-”, “MSG-” y así sucesivamente. Cuando cualquiera de estas abreviaturas se usa en una fórmula estructural, la abreviatura se muestra con la intención de que un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno que participa en un enlace glucosídico en el extremo reductor a otra unidad estructural no se incluya en la abreviatura que indica el glicano, a menos que se defina específicamente.

[0152]

En la presente invención, un monosacárido como unidad básica de un glicano se indica por conveniencia de modo que en la estructura del anillo, la posición de un átomo de carbono que se une a un átomo de oxígeno que constituye el anillo y que se une directamente a un grupo hidroxi (o un átomo de oxígeno involucrado en un enlace glucosídico) se define como la posición 1 (la posición 2 solo para los ácidos siálicos), a menos que se especifique lo contrario. Los nombres de los compuestos en los Ejemplos se proporcionan cada uno en vista de la estructura química en su conjunto, y esa regla no se aplica necesariamente.

[0153]

Cuando un glicano se indica como un signo (por ejemplo, GLY, SG, MSG, GlcNAc) en la presente invención, el signo pretende, a menos que se defina lo contrario, incluir átomos de carbono que se extienden al extremo reductor y no pretende incluir N u O involucrados en un enlace glucosídico de N u O.

[0154]

En la presente invención, a menos que se indique específicamente, una estructura parcial cuando un glicano se une a una cadena lateral de un aminoácido se indica de tal manera que la porción de la cadena lateral se indica entre paréntesis, por ejemplo, "(SG-)Asn".

[0155]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención está representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 82]




en donde el anticuerpo Ab o un fragmento funcional del anticuerpo puede unirse desde una cadena lateral de un residuo de aminoácido del mismo (por ejemplo, cisteína, lisina) directamente a L, o unirse a través de un glicano o glicano remodelado de Ab a L, y preferiblemente se une a través de un glicano o glicano remodelado de Ab a L, y más preferiblemente se une a través de un glicano remodelado de Ab a L.

[0156]

Los glicanos en Ab de la presente invención son glicanos unidos a N o glicanos unidos a O, y preferiblemente glicanos unidos a N.

Los glicanos unidos a N y los glicanos unidos a O se unen a una cadena lateral de aminoácidos de un anticuerpo a través de un enlace N-glucosídico y un enlace O-glucosídico, respectivamente.

[0157]

Ab de la presente invención es IgG, y preferiblemente IgG1, IgG2 o IgG4.

[0158]

IgG tiene un glicano bien conservado unido a N en un residuo de asparagina en la posición 297 de la región Fc de la cadena pesada (en adelante denominado “Asn297 o N297”), y se sabe que el glicano unido a N contribuye a la actividad y cinética de la molécula del anticuerpo.

(Biotechnol. Prog., 2012, 28, 608-622, Sanglier-Cianferani, S., Anal. Chem., 2013, 85, 715-736)

[0159]

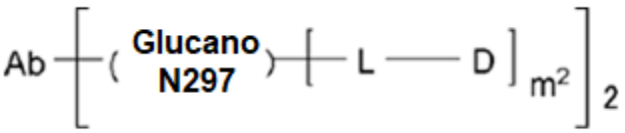
La secuencia de aminoácidos en la región constante de IgG está bien conservada, y cada aminoácido se especifica por la numeración del índice de la UE en Edelman et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., Vol. 63, No. 1 (15 mayo de 1969), páginas 78-85). Por ejemplo, Asn297, a la que un glicano unido a N está añadido en la región Fc, corresponde a la posición 297 en la numeración del índice de la UE, y cada aminoácido se especifica de manera única por la numeración del índice de la UE, incluso si la posición real del aminoácido ha variado a través de la fragmentación de la molécula o deleción de una región.

[0160]

En el fármaco inmunoconjugado de la presente invención, el anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo se une más preferiblemente a L mediante un enlace de glicano a una cadena lateral de Asn297 del mismo (en lo sucesivo, denominado “glicano N297”), y el anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo se une aún más preferiblemente a través del glicano N297 a L, en el que el glicano N297 es un glicano remodelado.

La siguiente fórmula ilustra la situación en la que el fármaco inmunoconjugado de la presente invención o un fragmento funcional de los anticuerpos se une a través del glicano N297 a L.

[Fórmula 83]




Un anticuerpo que tiene el glicano remodelado se denomina anticuerpo remodelado con glicano.

[0161]

SGP, una abreviatura de sialil glucopéptido, es un glicano complejo unido a N representativo. El SGP se puede separar/purificar de la yema de un huevo de gallina, por

ejemplo, utilizando un método descrito en el documento WO 2011/0278681. Los productos purificados de SGP están disponibles en el mercado (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., FUSHIMI Pharmaceutical Co., Ltd.), y se pueden comprar. Por ejemplo, el disialooctasacárido (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), un glicano formado al eliminar un GlcNAc en el extremo reductor en la fracción de glicano de SG (en lo sucesivo, "SG(10)"), está disponible en el mercado.

[0162]

En la presente invención, una estructura de glicano formada al eliminar un ácido siálico en un extremo no reductor solo en una de las cadenas ramificadas de ®–Mαν en SG(10) se refiere a MSG(9), y una estructura que tiene un ácido siálico solo en la cadena ramificada 1-3 se denomina MSG1, y una estructura que tiene un ácido siálico solo en la cadena ramificada 1-6 se denomina MSG2.

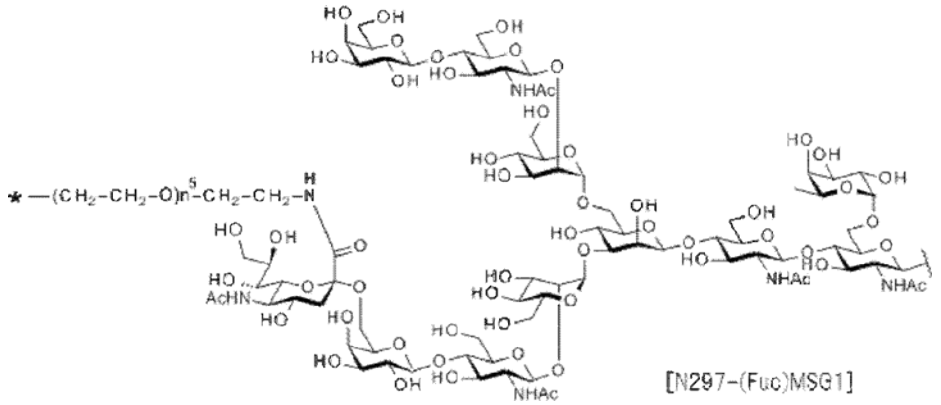
[0163]

El glicano remodelado de la presente invención es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, o una mezcla de N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2, o N297- (Fuc)SG, y es preferiblemente N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, o N297-(Fuc)SG, y más preferiblemente N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2.

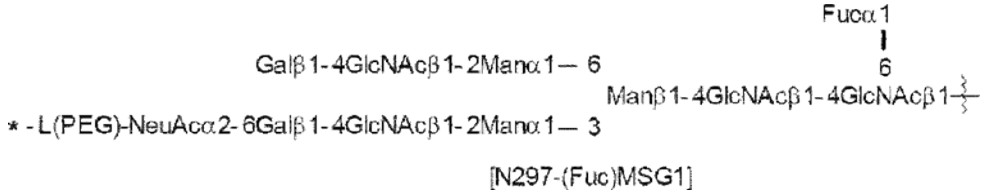
[0164]

N297-(Fuc) MSG1 está representado por la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:

[Fórmula 84]




[Fórmula 85]




En las fórmulas, cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) representa -($CH_2CH_2$-O)$n^5$-$CH_2CH_2$-NH-, en donde el grupo amino en el extremo derecho representa un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-3 de ®–Mαν en el glicano N297;

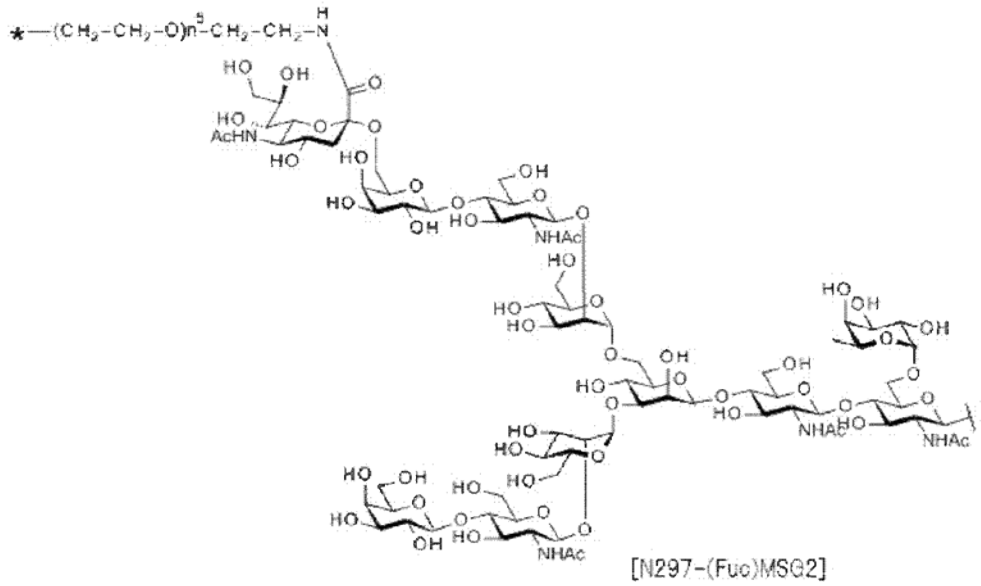
cada asterisco representa la unión al enlazador L, en particular, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo 1,2,3-triazol de Lb en el enlazador L, y

$n^5$ es un número entero de 2 a 10 y es preferiblemente un número entero de 2 a 5.

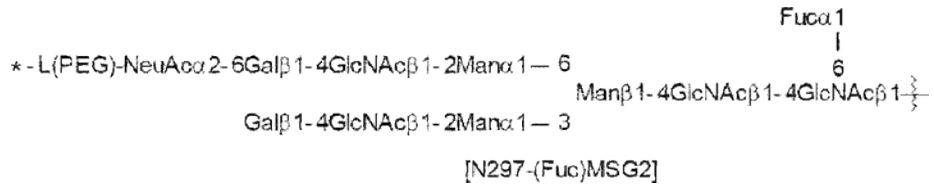
[0165]

N297-(Fuc)MSG2 está representado por la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:

[Fórmula 86]




[Fórmula 87]




En las fórmulas, cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) representa -($CH_2CH_2$-O)$n^5$-$CH_2CH_2$-NH-, en donde el grupo amino en el extremo derecho representa un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en la cadena ramificada 1-6 de ®–Mαν en el glicano N297;

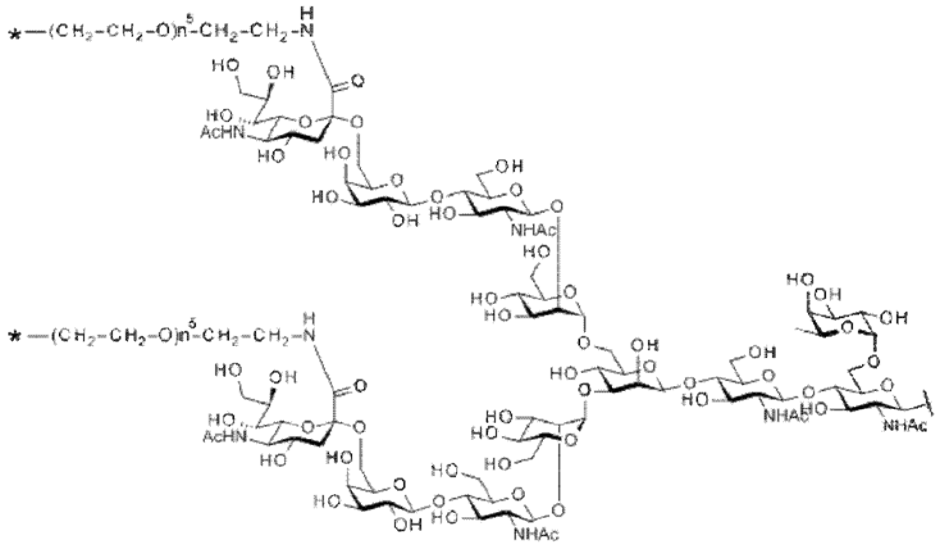
cada asterisco representa la unión al enlazador L, en particular, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo 1,2,3-triazol de Lb en el enlazador L, y

$n^5$ es un número entero de 2 a 10 y es preferiblemente un número entero de 2 a 5.

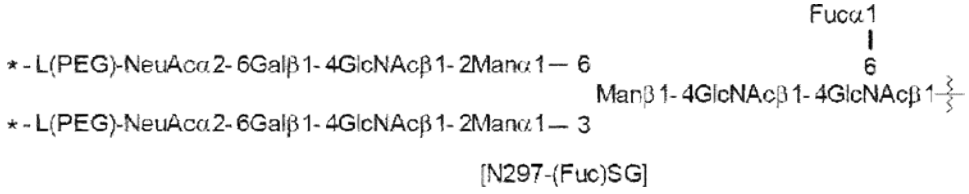
[0166]

N297-(Fuc)SG está representado por la siguiente fórmula estructural o fórmula de secuencia:

[Fórmula 88]



[Fórmula 89]




[N297-(Fuc)SG]

En las fórmulas, cada línea ondulada representa la unión a Asn297 del anticuerpo,

L(PEG) representa -($CH_2CH_2$-O)$n^5$-$CH_2CH_2$-NH-, en donde el grupo amino en el extremo derecho representa un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 de ®–Mαν en el glicano N297,

cada asterisco representa la unión al enlazador L, en particular, un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo 1,2,3-triazol de Lb en el enlazador L, y

$n^5$ es un número entero de 2 a 10 y es preferiblemente un número entero de 2 a 5.

[0167]

Si el glicano N297 del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, o una mezcla de ellos, el fármaco inmunoconjugado es una molécula a la que se le han conjugado dos moléculas del enlazador L y dos moléculas del fármaco D ($m^2$=1), ya que el anticuerpo es un dímero (véase Figura 1).

Por ejemplo, Ejemplo 74: ADC8 es en el caso de que el glicano N297 sea N297-(Fuc)MSG1, y el Ejemplo 67: ADC1 es en el caso de que el glicano N297 sea una mezcla de N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2.

[0168]
Si el glicano N297 del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención es N297-(Fuc)SG, el fármaco inmunoconjugado es una molécula a la que se le han conjugado cuatro moléculas del enlazador L y cuatro moléculas del fármaco D ($m^2$=2), ya que el anticuerpo es un dímero. Por ejemplo, Ejemplo 72: ADC6 es en el caso de que el glicano N297 sea N297-(Fuc)SG.
[0169]
El glicano N297 es preferiblemente N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 o N297-(Fuc)SG, y más preferiblemente N297-(Fuc)MSG1 o N297-(Fuc)MSG2.
Si el glicano N297 del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 o N297-(Fuc)SG, se puede obtener un ADC homogéneo.
[0170]
La presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo remodelado o un fragmento funcional del anticuerpo, el método que incluye los siguientes pasos de:
i) cultivar la célula huésped (por ejemplo, una célula animal (tal como una célula CHO)) de acuerdo con cualquiera de [46] a [48] y recolectar un anticuerpo objetivo de un cultivo obtenido;
ii) tratar el anticuerpo obtenido en el paso i) con hidrolasa para producir un anticuerpo con glicano N297 que es (Fucα1,6)GlcNAc (anticuerpo(Fucα1,6)GlcNAc) (Figura 3A);
preferiblemente purificando adicionalmente el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc a través de un paso que incluye la purificación de la solución de reacción con una columna de hidroxiapatita;
y cualquiera de iii)-1 y iii)-2 (Figura 3B):
iii)-1 hacer reaccionar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc con una molécula donadora de glicano en presencia de transglicosidasa para sintetizar un anticuerpo remodelado con glicano con un grupo azida introducido en un ácido siálico, la molécula donadora de glicano obtenida al introducir un enlazador PEG que tiene un grupo azida (N3-L(PEG)) con el grupo carbonilo de ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en MSG(9) o SG(10) y oxazolinizar el extremo reductor; y
iii)-2 hacer reaccionar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc con una molécula donadora de glicano en presencia de transglucosidasa para sintetizar un anticuerpo remodelado con glicano con un grupo azida introducido en un ácido siálico, la molécula donadora de glicano obtenida al introducir un enlazador PEG que tiene un grupo azida (N3-L(PEG)) al grupo carbonilo de ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en (MSG-)Asn o

(SG-)Asn con un grupo α-amino opcionalmente protegido o modificado y al grupo carbonilo de ácido carboxílico en el Asn, utilizando hidrolasa, y luego oxazolinizando el extremo reductor.

La presente invención incluye anticuerpos remodelados con glicano y fragmentos funcionales de los anticuerpos, y variantes modificadas de los anticuerpos y fragmentos funcionales obtenidos con el uso del método de producción.

[0171]

El intermedio de producción del presente fármaco inmunoconjugado tiene una estructura alquina reactiva con un grupo azida, tal como DBCO (dibenzociclooctino). Por lo tanto, el fármaco inmunoconjugado de la presente invención se puede producir al reaccionar el intermedio de producción con un anticuerpo remodelado con glicano de tipo MSG1, tipo MSG2 o tipo SG o un fragmento funcional del anticuerpo, donde el anticuerpo, en el que un enlazador PEG que tiene un grupo azida se ha introducido en un ácido siálico de un glicano, se obtiene a través de los pasos i) a iii).

[0172]

Con respecto al glicano N297 en la presente invención, el GlcNAc((Fucα1,6)GlcNAc) fucosilado en el extremo reductor se deriva preferiblemente de un anticuerpo producido en una célula animal, y una porción del glicano localizado en el lado extremo no reductor del (Fucα1,6)GlcNAc se remodelo preferiblemente en la estructura de glicano que se describe anteriormente como MSG (MSG1, MSG2) o SG. En cada caso, el enlace de ácido carboxílico a la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor se usa para unir a L(PEG).

Tal anticuerpo remodelado con glicano que tiene glicano N297 tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG puede producirse con el uso de un método que se ilustra en la Figura 3, por ejemplo, de acuerdo con un método descrito en el documento WO 2013/120066. Si se produce un anticuerpo como una proteína recombinante génica utilizando una célula animal como huésped de acuerdo con un método conocido (paso i), el glicano N297 tiene, como estructura base, una estructura fucosilada de glicano unida a N, mientras que se proporciona una mezcla de moléculas de anticuerpos que tienen glicanos de diversas estructuras con diversas modificaciones para la estructura de los extremos no reductores o sacáridos constituyentes o fragmentos de tales moléculas de anticuerpos (IV en la Figura 3A). El tratamiento de dicho anticuerpo producido con una célula animal con hidrolasa como EndoS provoca la hidrólisis del enlace glucosídico en GlcNAcβ1- 4GlcNAc en la estructura de quitobiosis en el extremo reductor, proporcionando moléculas del anticuerpo de la estructura de un único glicano que tiene solo (Fucα1,6)GlcNAc como glicano N297

(denominado “anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc”, véase A en la Figura 2) (Figura 3A) (paso ii)). [0173]

Para la enzima para la reacción de hidrólisis del glicano N297, por ejemplo, se puede usar EndoS o una enzima variante que retiene la actividad de hidrólisis.

[0174]

Al reaccionar el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc obtenido en la reacción de hidrólisis anterior, como una molécula aceptora de glicano, y una molécula donante de glicano de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG con el uso de transglucosidasa (por ejemplo, WO 2017010559) como variantes EndoS D233Q y EndoS D233Q/Q303L, se puede obtener un anticuerpo de la estructura descrita anteriormente que incluye glicano N297 de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG (véase B en la Figura 2) (Figura 3B) (paso iii)-1, iii)-2).

[0175]

Si el número de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo, $m^2$, en el fármaco inmunoconjugado es 1, se emplea una molécula donante de glicano que tiene MSG, MSG1 o MSG2 como glicano. Para dicho glicano, el monosialo-Asn libre que está disponible en el mercado (1S2G/1G2S-10NC-Asn, GlyTech, Inc., en lo sucesivo denominado “(MSG-)Asn”), como materia prima, puede separarse de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 56 para obtener (MSG-)Asn1 o (MSG2-)Asn, que puede emplearse, o una mezcla de ellos puede emplearse, sin separación.

[0176]

Si el número de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo, $m^2$, en el fármaco inmunoconjugado es 2, se usa una molécula donante de glicano que incluye SG(10) como glicano para la reacción de transglicosilación. Para dicho glicano SG(10), por ejemplo, se puede usar el obtenido de SGP a través de hidrólisis o similar, o se puede usar glicano SG(10) tal como disialoctactacárido disponible en el mercado (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.).

[0177]

El glicano de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG incluido en la molécula donante tiene un enlazador PEG que tiene un grupo azida (N3-L(PEG)) en la posición 2 de un ácido siálico. Para introducir un enlazador PEG que tenga un grupo azida ($N_3$-L(PEG)) en la posición 2 de un ácido siálico, se puede usar una reacción conocida en el campo de la química orgánica sintética (por ejemplo, reacción de condensación) para MSG (MSG (9)), MSG1 o MSG2, o el disialooctasacárido (SG(10)) y el enlazador PEG que tiene un grupo azida ($N_3$-L(PEG))$n_3$-($CH_2CH_2$-O)$n_5$-$CH_2CH_2$-$NH_2$, en donde $n_5$ es un número entero de 2 a 10, y preferiblemente representa un número entero de 2 a 5. Específicamente, el ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico y el grupo amino en el extremo

derecho de $N_3$-($CH_2CH_2$-O)$n_5$-$CH_2CH_2$-NH experimentan una reacción de condensación para formar un enlace amida.

[0178]

Alternativamente, se puede obtener glicano de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG mediante la introducción de un enlazador PEG que tiene un grupo azida ($N_3$-($CH_2CH_2$-O)$n_5$-$CH_2CH_2$-$NH_2$) al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico de una materia prima como (MSG1-)Asn, (MSG2-)Asn y (SG-)Asn (GlyTech, Inc.) con un grupo α-amino opcionalmente protegido o modificado y al ácido carboxílico del Asn con el uso de reacción de condensación, y utilizando hidrolasa tal como EndoM y EndoRp (iii)-2). Ejemplos de grupos protectores para grupos α-amino pueden incluir, entre otros, un grupo acetilo (Ac), un grupo t-butoxicarbonilo (Boc), un grupo benzoilo (Bz), un grupo bencilo (Bzl), un carbobenzoxi (Cbz) ) y un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). El grupo protector para grupos α-amino es preferiblemente un grupo Fmoc.

Ejemplos de grupos modificadores para grupos α-amino incluyen grupos modificadores que potencian la solubilidad en agua con un grupo hidroxiacetilo, una estructura PEG o similares.

Un grupo α-amino de (MSG1-)Asn, (MSG-2)Asn o (SG-)Asn está preferiblemente protegido con cualquiera de los grupos protectores. Si un grupo α-amino está protegido con un grupo protector (por ejemplo, un grupo Fmoc), el grupo protector puede eliminarse, según sea necesario, después de la introducción de un enlazador PEG que tenga un grupo azida y antes de provocar la acción de la hidrolasa.

[0179]

Se prefiere usar una forma activada tal como una forma oxazolinatada formada por tratamiento con 2-cloro-1,3-dimetil-1H-bencimidazol-3-ium-cloruro para GlcNAc en el extremo reductor del glicano de tipo MSG (MSG1, MSG2) o SG incluido en la molécula.

[0180]

Se pueden emplear varias enzimas para usar en la reacción de transglicosilación (transglicosidasa) que tengan actividad de transferir glicano complejo al glicano N297; sin embargo, la EndoS D233Q, un producto modificado para el cual se suprime la reacción de hidrólisis al sustituir Asp en la posición 233 de EndoS con Gln, es una transglucosidasa preferida. Por ejemplo, en el documento WO 2013/120066, se describe la reacción de transglicosilación con el uso de EndoS D233Q. Alternativamente, se puede usar una enzima modificada como EndoS D233Q/Q303L (WO 2017010559), que se obtiene al agregar una mutación adicional a EndoS D233Q.

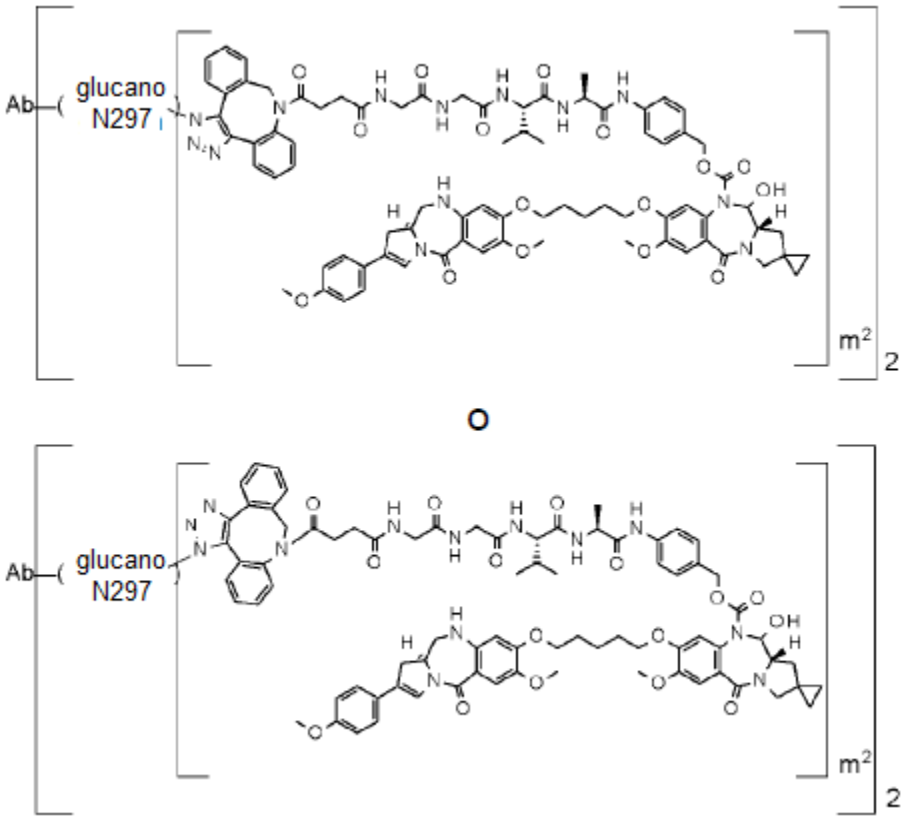
[0181]

La operación de purificación del anticuerpo después de la remodelación del glicano para el anticuerpo (reacción de glucohidrólisis y transglicosilación) está destinada a separar compuestos y enzimas de bajo peso molecular utilizados para la reacción, y se utilizan comúnmente cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc., para dicha purificación, y se puede llevar a cabo una purificación adicional con una columna de hidroxiapatita. Es decir, la presente invención proporciona un método para producir el fármaco conjugado, el método incluye, después del paso de purificar un intermedio de la solución de reacción después de la glucohidrólisis de un anticuerpo, el paso adicional de purificar con una columna de hidroxiapatita. Según un ejemplo de informes sobre remodelación de glicano (J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308-12318., Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 2361-2367), la solución de reacción después del tratamiento de un anticuerpo con hidrolasa se purifica solo con una columna de proteína A (columna de cromatografía de afinidad); sin embargo, se ha demostrado que este método de purificación es incapaz de eliminar por completo la hidrolasa (por ejemplo, EndoS) y afecta la reacción de transglucosilación posterior debido a la enzima residual. En vista de tal resultado, se realizó un examen de los métodos de purificación para encontrar que cuando la purificación de la solución de reacción después del tratamiento de un anticuerpo con hidrolasa se llevó a cabo utilizando una columna de Proteína A y una columna de hidroxiapatita (columna CHT, Bio-Rad Laboratories, Inc .) en el orden presentado, la eficiencia de reacción de la reacción de glicosilación posterior se mejoró, sin la influencia de una enzima residual.

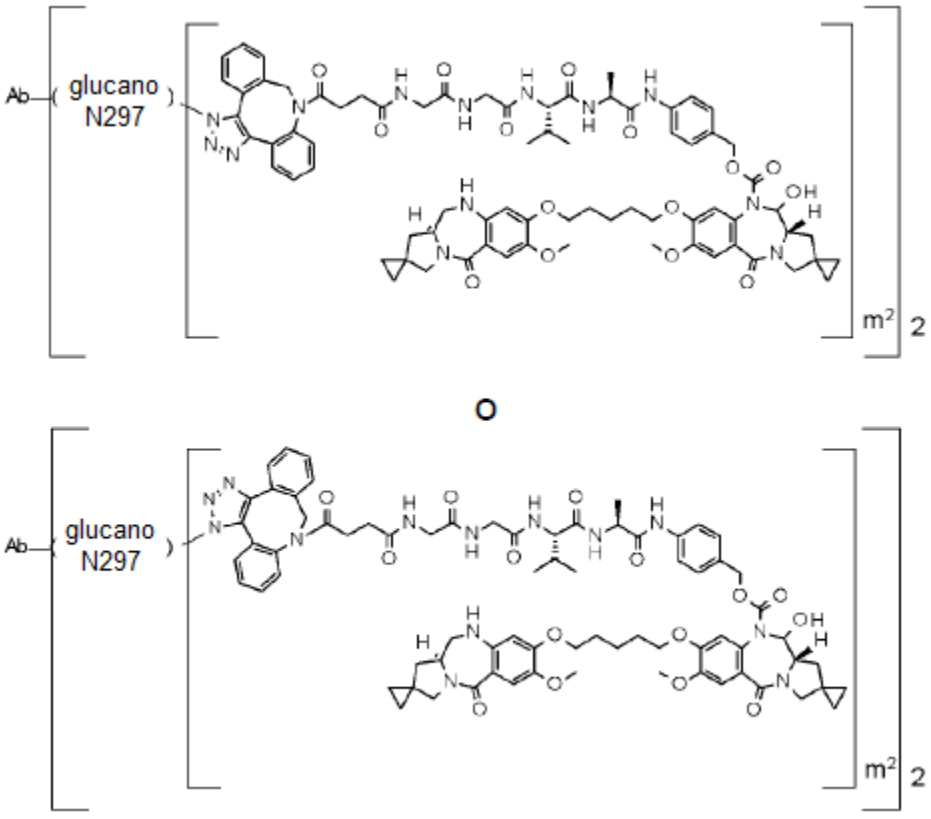
[0182]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención es el más preferible fármaco inmunoconjugado seleccionado del siguiente grupo:

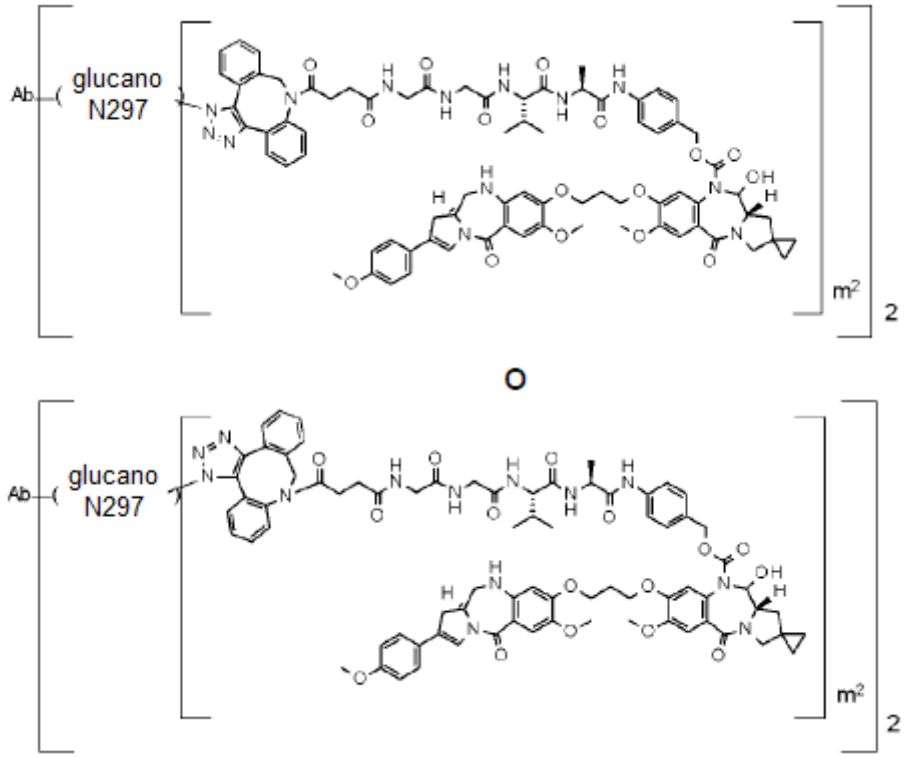
[Fórmula 90]



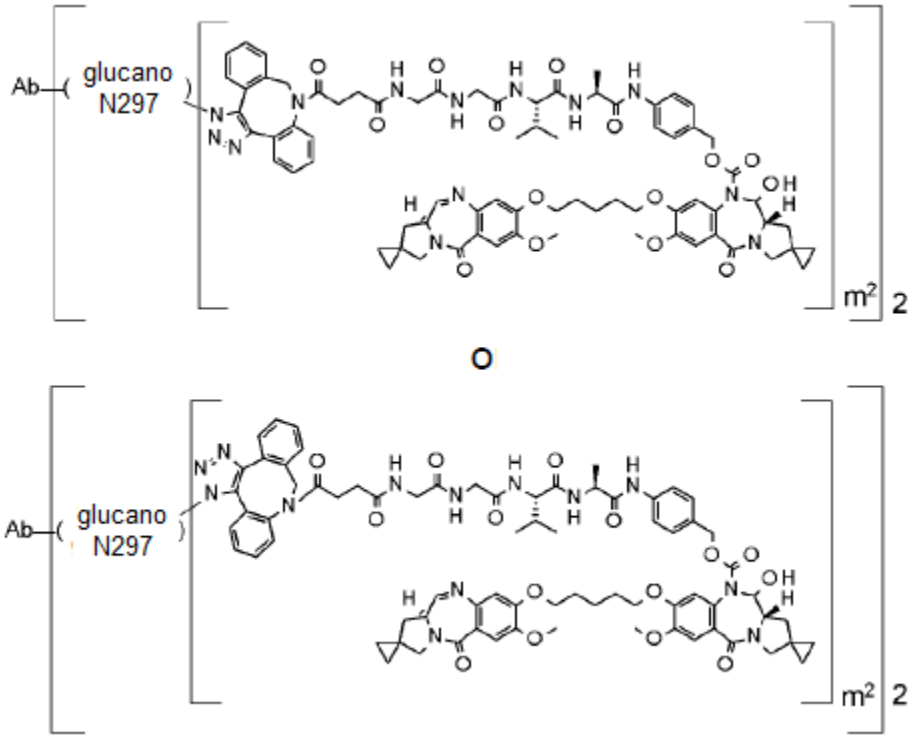

[Fórmula 91]



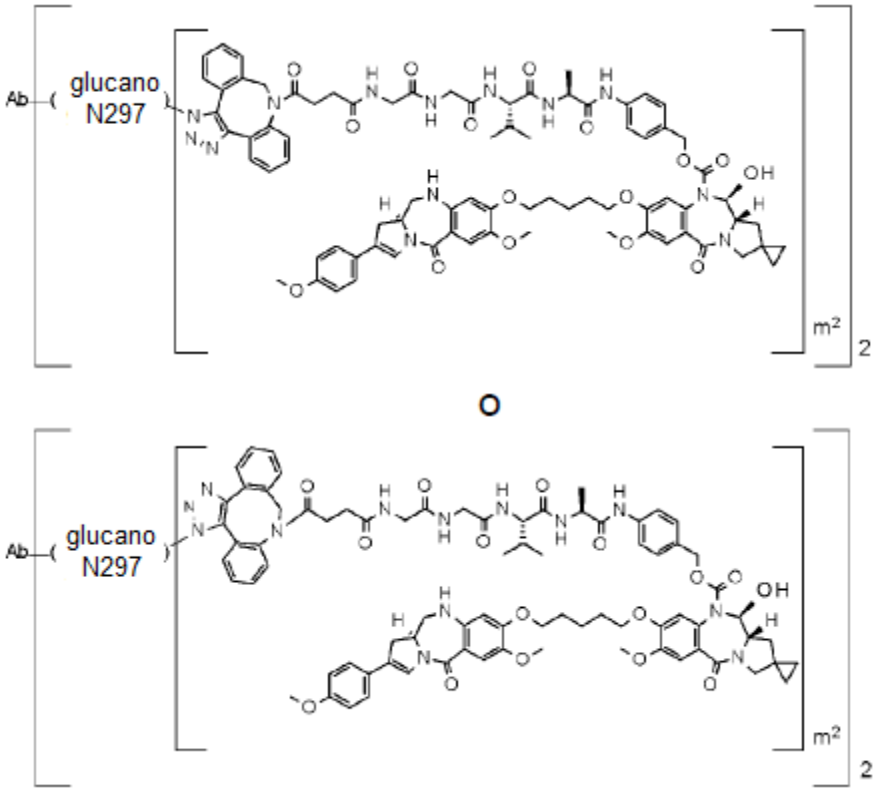

[Fórmula 92]



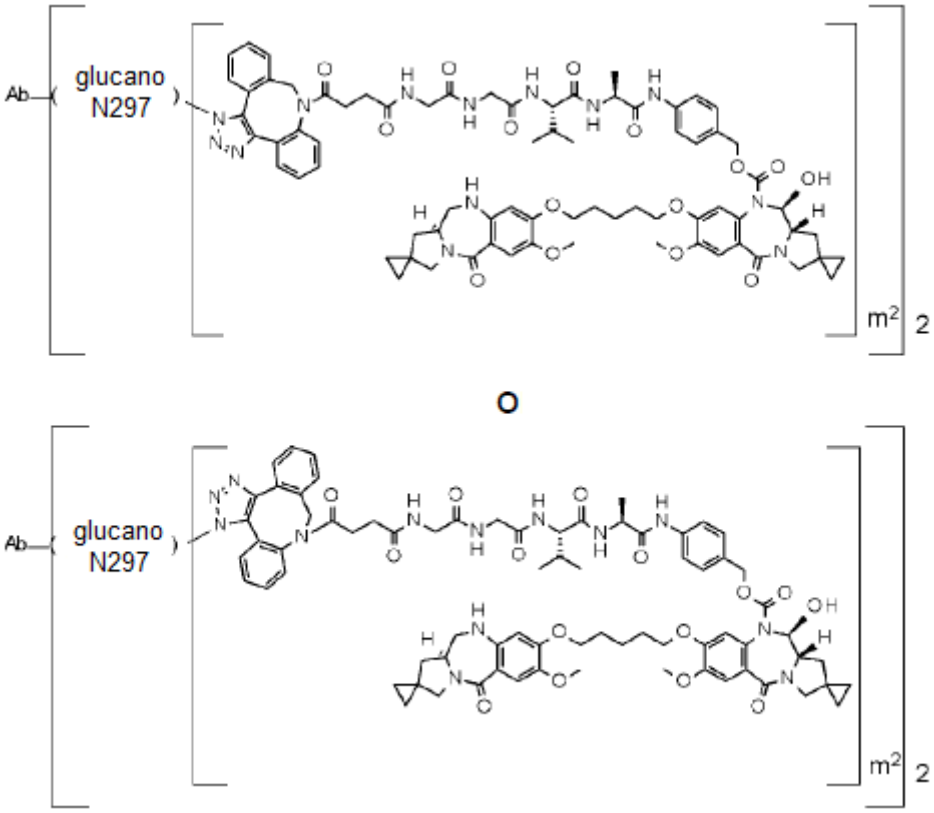

[Fórmula 93]



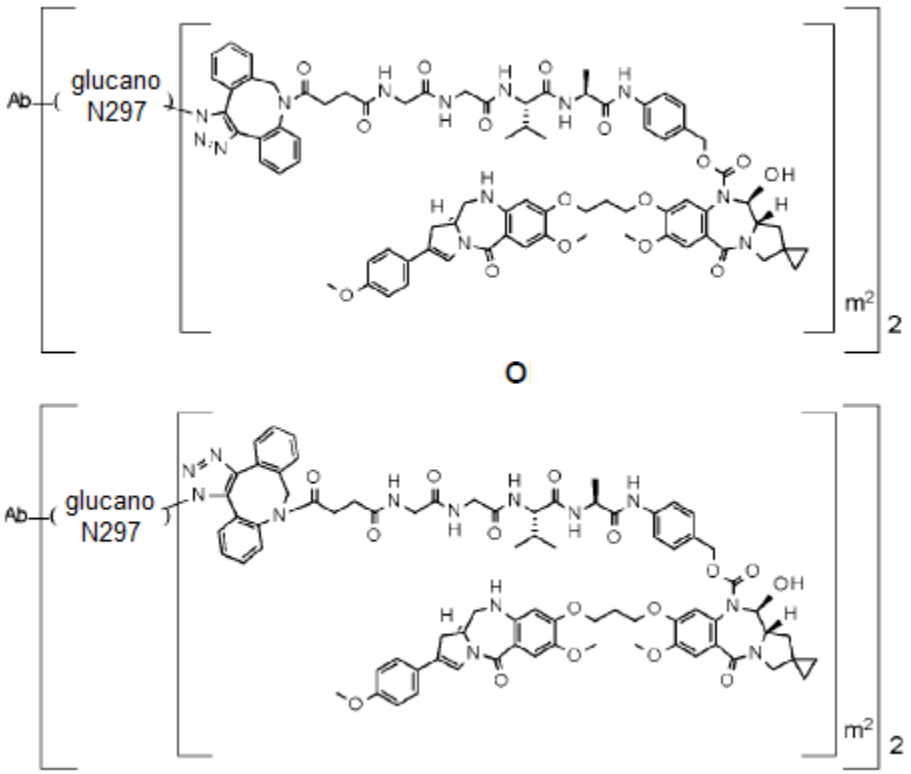

[Fórmula 94]



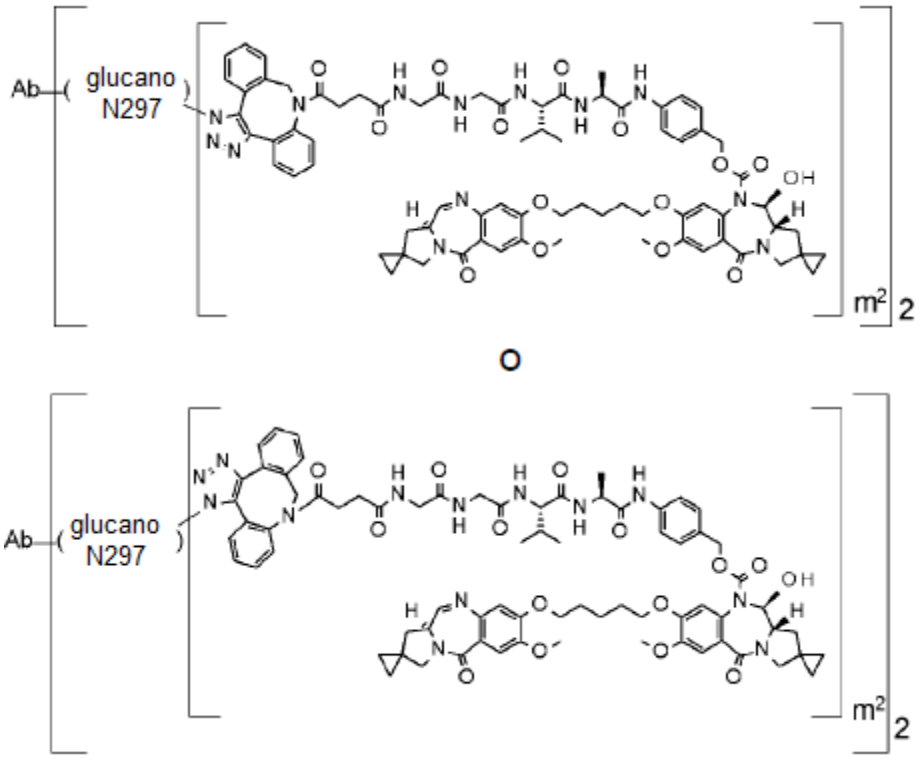

[Fórmula 95]



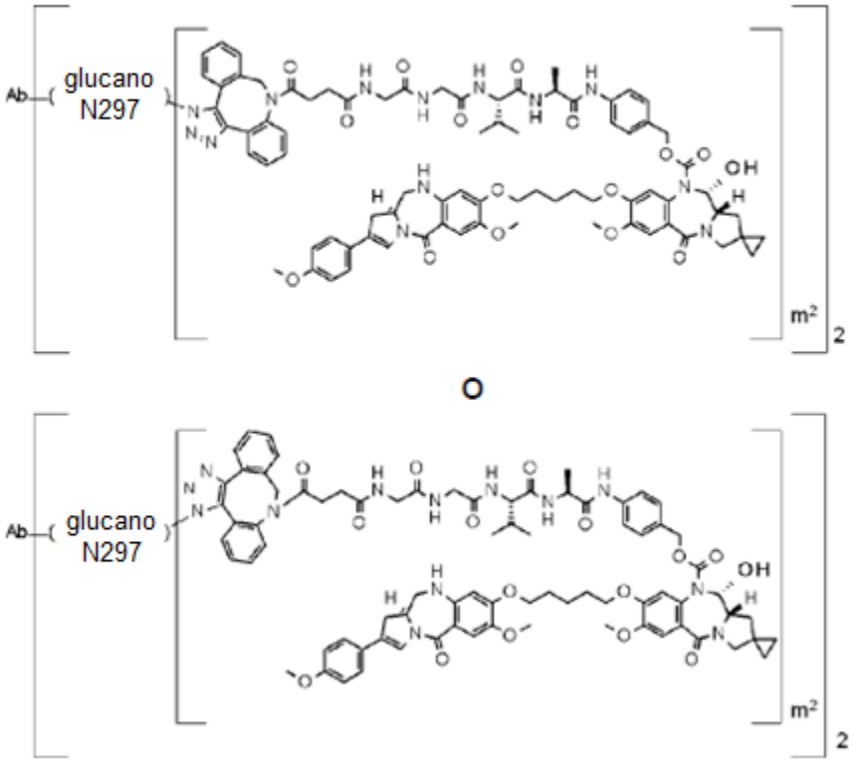

[Fórmula 96]



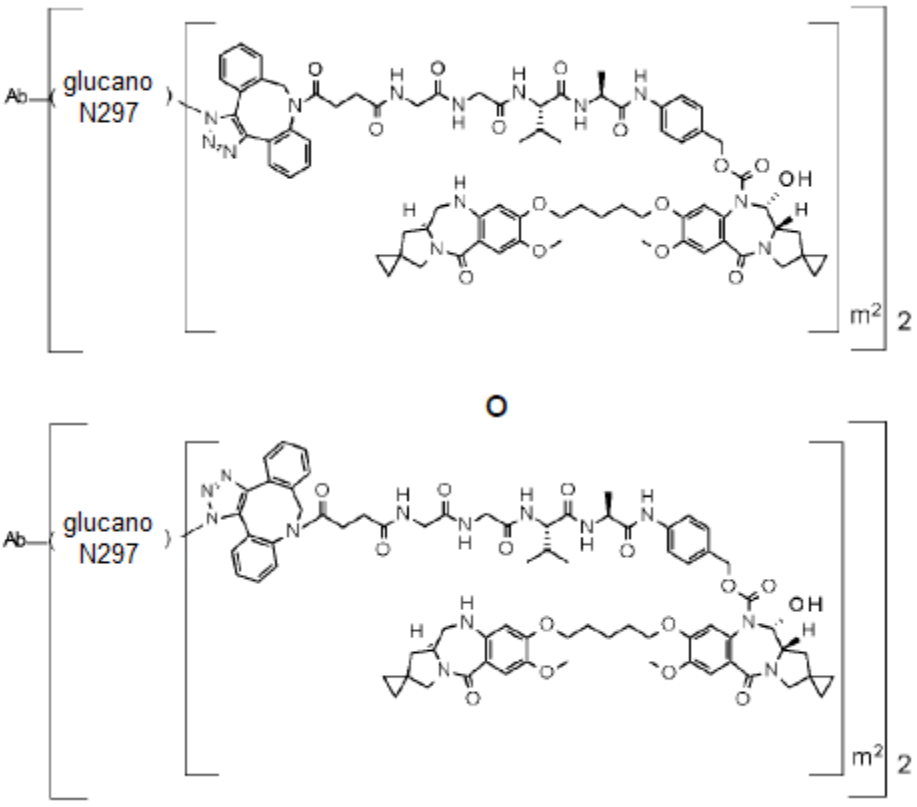

[Fórmula 97]



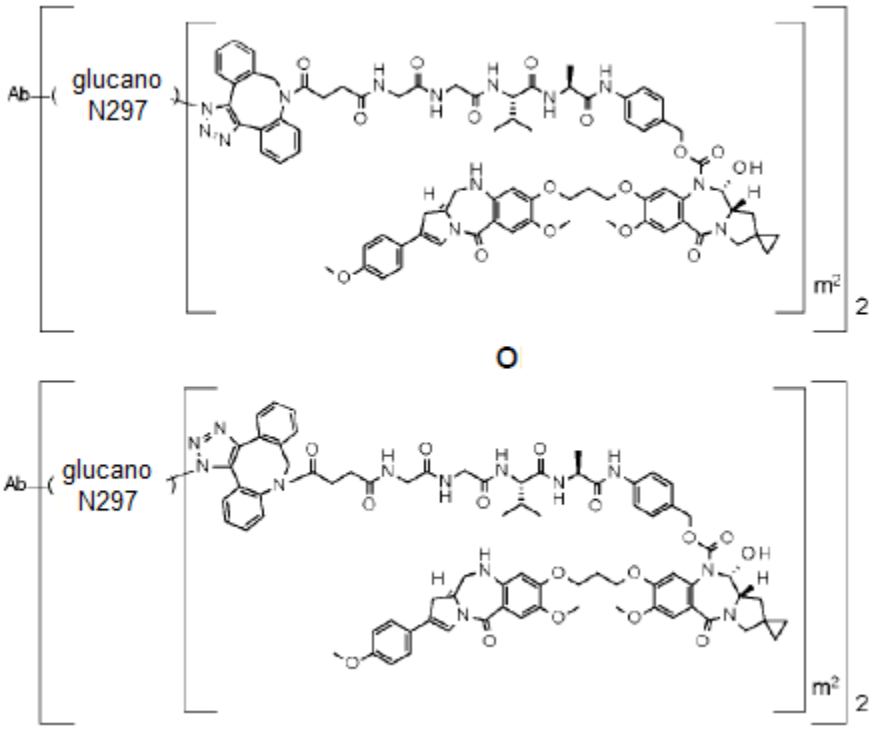

[Fórmula 98]




[Fórmula 99]

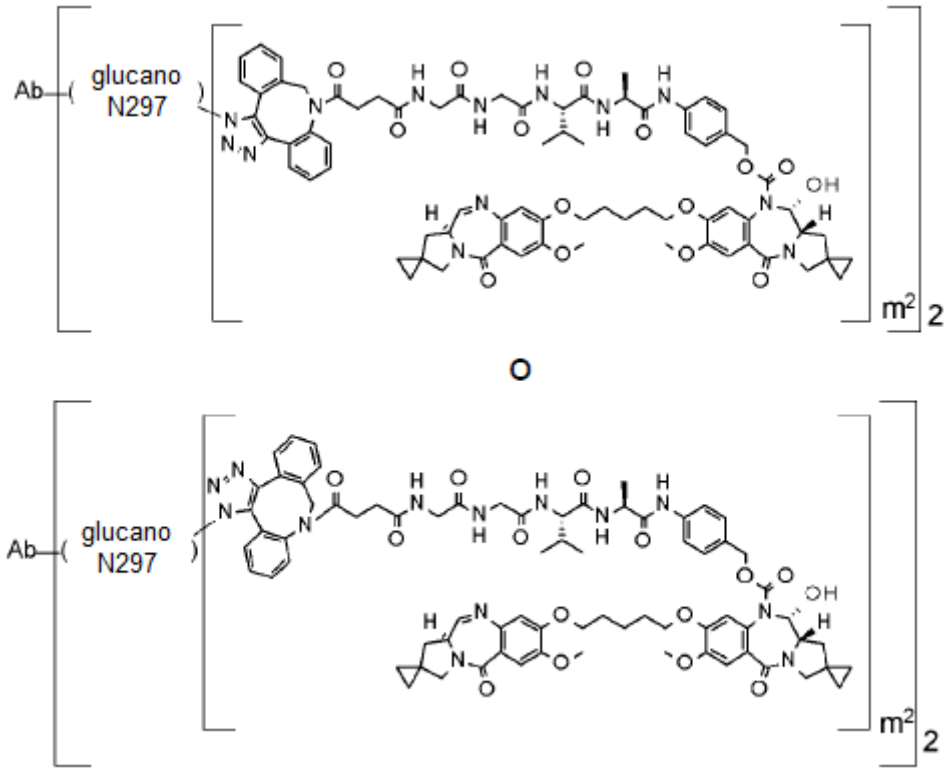



[Fórmula 100]




, o

[Fórmula 101]




En cada una de las fórmulas estructurales anteriores,

$m^2$ representa 1 o 2 (preferiblemente, $m^2$ es 1),

el anticuerpo Ab es un anticuerpo IgG (preferiblemente, IgG1, IgG2 o IgG4, más preferiblemente, IgG1), o un fragmento funcional del anticuerpo,

El glicano N297 representa a cualquiera de N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2, y una mezcla de ellos, y N297-(Fuc)SG (preferiblemente, N297-(Fuc)MSG1),

L(PEG) representa -NH-$CH_2CH_2$-(O-$CH_2CH_2$)$_3$-*, en donde el grupo amino en el extremo izquierdo representa un enlace amida al ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico en el extremo no reductor en cada una o en una de las cadenas ramificadas 1-3 y 1-6 (preferiblemente, la cadena ramificada 1-3) de ®–Mαν en el glicano N297, y el asterisco representa la unión a un átomo de nitrógeno en la posición 1 o 3 del anillo de triazol de Lb en el enlazador L.

Aunque las estructuras con dos o cuatro unidades ($m^2$= 1 o 2) de "-(glicano N297)-LD" en cada una de las cuales el glicano N297 se une al átomo de nitrógeno en la posición 1 del anillo de triazol de Lb en L en una molécula conjugada ("(glicano N297)-(N1Lb)LD") o las estructuras con dos o cuatro unidades ($m^2$ = 1 o 2) de "-(glicano N297)-LD" en cada una de las cuales el glicano N297 se une al átomo de nitrógeno en la posición 3 del anillo de triazol de Lb en L en una molécula conjugada ("(glicano N297)-(N3Lb)LD") se ilustran como el fármaco inmunoconjugado más preferido por conveniencia, también se incluyen fármacos inmunoconjugados que tienen tanto "(glicano N297)-(N1Lb)LD" (si $m^2$ = 1, entonces una unidad, si $m^2$ = 2, entonces una, dos o tres unidades) como "(glicano N297)-(N3Lb)LD" (si $m^2$ = 1, entonces una unidad, si $m^2$ = 2, entonces también se incluyen tres, dos o una unidad) en una molécula conjugada. En otras palabras, ya sea uno de "(glicano N297)-(N1Lb)L-D" y "(glicano N297)-(N3Lb)L-D" existe o ambos coexisten en una molécula conjugada.

[0183]

Además, Ab es preferiblemente un anticuerpo anti-CLDN6, un anticuerpo anti-CLDN6/CLDN9, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-DLL3, un anticuerpo anti-FAP, un anticuerpo anti-CDH11, un anticuerpo anti-A33, un anticuerpo anti-CanAg, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD56, un anticuerpo anti-CD70, un anticuerpo anti-CD98, un anticuerpo anti-TROP2, un anticuerpo anti-CEA, un anticuerpo anti-Cripto, un anticuerpo anti-EphA2, un anticuerpo anti-FGFR2, un anticuerpo anti-G250, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-GPNMB, un anticuerpo anti-integrina, un anti PSMA, un anticuerpo anti-tenascina-C, un anticuerpo anti-SLC44A4, un anticuerpo anti-mesotelina, un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-DR5, más preferiblemente un anticuerpo anti-CLDN6, un anticuerpo anti-CLDN6/CLDN9, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-CD98 o un anticuerpo anti-TROP2, e incluso más preferiblemente el anticuerpo anti-CLDN6 (por ejemplo, Ejemplo 106, 107, 108, 109) o anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab, una variante del trastuzumab).

[0184]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención y el fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 o anti-HER2 de la presente invención exhiben una fuerte actividad tumoral (actividad antitumoral in vivo, actividad anticelular in vitro) y propiedades cinéticas y físicas in vivo satisfactorias, y tienen una alta seguridad, y por lo tanto son útiles como productos farmacéuticos.

[0185]

Pueden existir estereoisómeros, isómeros ópticos debido a un átomo de carbono asimétrico, isómeros geométricos, tautómeros o isómeros ópticos tales como formas d, formas l y atropisómeros para el fármaco inmunoconjugado de la presente invención, y un fármaco libre o intermedio de producción del fármaco inmunoconjugado, y todos estos isómeros, isómeros ópticos y mezclas de ellos están incluidos en la presente invención. El derivado de PBD (V) o (VI) de la presente invención tiene un carbono asimétrico en la posición 11' y, por lo tanto, existen isómeros ópticos. Aquí, todos estos isómeros y mezclas de estos isómeros están representados por una sola fórmula, a saber, la fórmula general (V) o (VI). En consecuencia, (V) o (VI) incluyen todos los isómeros ópticos y mezclas de los isómeros ópticos en cualquier proporción. La configuración estérica absoluta en la posición 11' de (V) o (VI) se puede determinar mediante análisis de estructura cristalina de rayos X o RMN, como un método Mosher para su producto cristalino o intermedio, o un derivado del mismo. Entonces, la configuración estérica absoluta puede determinarse usando un producto cristalino o intermedio derivatizado con un reactivo que tiene un centro asimétrico cuya configuración estérica es conocida. Según se desee, los estereoisómeros del compuesto sintetizado según la presente invención pueden obtenerse al aislarlos con un método de resolución óptica o método de separación común.

[0186]

El número de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo es un factor importante que influye en la eficacia y seguridad del fármaco inmunoconjugado de la presente invención. Los fármacos inmunoconjugados se producen con condiciones de reacción, como las cantidades de materias primas y reactivos a reaccionar, especificados para dar un número constante de moléculas del fármaco conjugado, pero, en contraste con la reacción química de compuestos de bajo peso molecular, se obtiene normalmente una mezcla con diferentes números de moléculas del fármaco conjugado. Los números de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo se especifican como el valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas del fármaco conjugado (DAR: proporción de fármaco a anticuerpo). El número de moléculas del derivado de pirrolobenzodiazepina conjugadas con una molécula del anticuerpo es controlable, y de 1 a 10 moléculas del derivado de pirrolobenzodiazepina se pueden conjugar como el número

promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo (DAR), pero preferiblemente el número es de uno a ocho, y más preferiblemente de uno a cinco.

Si el anticuerpo se une a través de un glicano remodelado del anticuerpo a L en el fármaco inmunoconjugado de la presente invención, el número de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado, $m^2$, es un número entero de 1 o 2. Si el glicano es glicano N297 y el glicano es N297-(Fuc)MSG1, N297-(Fuc)MSG2 o una mezcla de N297-(Fuc)MSG1 y N297-(Fuc)MSG2, $m^2$ es 1, y DAR está en el rango de 1 a 3 (preferiblemente, en el rango de 1,0 a 2,5, más preferiblemente, en el rango de 1,2 a 2,2). Si el glicano N297 es N297-(Fuc)SG, $m^2$ es 2 y DAR está en el rango de 3 a 5 (preferiblemente, en el rango de 3,2 a 4,8, más preferiblemente, en el rango de 3,5 a 4,2).

Los expertos en la materia podrían diseñar el método de reacción para conjugar un número requerido de moléculas del fármaco a cada molécula del anticuerpo con base en la descripción y Ejemplos que se encuentran aquí, y obtener un anticuerpo con un número controlado de moléculas conjugadas del derivado de pirrolobenzodiazepina.

[0187]

El fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención puede absorber humedad, permitir la adhesión de agua adsorbida o convertirse en un hidrato cuando se deja en la atmósfera o recristalizarse, y dichos compuestos y sales que contienen agua también se incluyen en la presente invención.

[0188]

El fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención puede convertirse en una sal farmacéuticamente aceptable, según se desee, si tiene un grupo básico tal como un grupo amino. Ejemplos de tales sales pueden incluir, entre otros, sales de haluro de hidrógeno tales como clorhidratos e hidroyoduros; sales de ácido inorgánico tales como nitratos, percloratos, sulfatos y fosfatos; alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsufonatos tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como formiatos, acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos y maleatos; y sales de aminoácidos tales como ornitinatos, glutamatos y aspartatos.

[0189]

Si el fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención tiene un grupo ácido tal como un grupo carboxi, generalmente se puede formar una sal de adición de base. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir, entre otros, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, sales de potasio y sales de litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de

magnesio; sales inorgánicas tales como sales de amonio; y sales orgánicas de amina tales como sales de dibencilamina, sales de morfolina,
sales de éster alquilfenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamato, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de ciclohexilamina, sales de diciclohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-N-(2-feniletoxi)amina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano.

[0190]

El fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención puede existir como un hidrato, por ejemplo, mediante la absorción de humedad en el aire. El solvato de la presente invención no se limita a un solvato particular y puede ser cualquier solvato farmacéuticamente aceptable, y se prefieren específicamente hidratos, solvatos de etanol, solvatos de 2-propanol, etc. El fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención puede ser su forma de N-óxido si está presente un átomo de nitrógeno, y estos solvatos y formas de N-óxido están incluidos en el alcance de la presente invención.

[0191]

La presente invención incluye compuestos marcados con diversos isótopos radiactivos o no radiactivos. El fármaco inmunoconjugado, fármaco libre o intermedio de producción de la presente invención puede contener uno o más átomos constituyentes con proporciones no naturales de isótopos atómicos. Ejemplos de isótopos atómicos pueden incluir, entre otros, deuterio ($^{2}H$), tritio ($^{3}H$), yodo-125 ($^{125}I$) y carbono-14 ($^{14}C$).
El compuesto de la presente invención puede radiomarcarse con un isótopo radiactivo tal como tritio ($^{3}H$), yodo-125 ($^{125}I$) y carbono-14 ($^{14}C$). El compuesto radiomarcado es útil como agente terapéutico o profiláctico, un reactivo para la investigación, como un reactivo de ensayo, y un agente de diagnóstico, como un agente de diagnóstico para la obtención de imágenes in vivo. Todas las variantes isotópicas del fármaco inmunoconjugado de la presente invención están incluidas en el alcance de la presente invención, independientemente de si son radiactivas o no.

[0192]

[Métodos de producción]

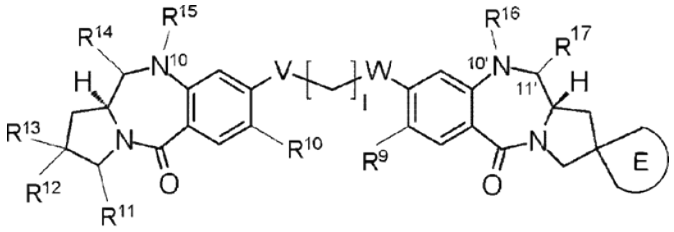
A continuación, se describirán métodos representativos para producir el fármaco inmunoconjugado de la presente invención y fármacos libres o productos intermedios de producción del mismo. A continuación, los números de compuestos que se muestran en las fórmulas de reacción se usan para identificar compuestos entre sí. Específicamente, se hará referencia en forma de "compuesto de fórmula (1)", "compuesto (1)", y así sucesivamente. Los compuestos con los otros números se indicarán de la misma manera.

[0193]

1. Método de producción 1

El compuesto (1) de la presente invención puede producirse de acuerdo con el esquema A al esquema Q descritos a continuación.

[Fórmula 102]



(1)

El esquema A al esquema M son cada uno un método para producir un intermedio de producción para el fármaco inmunoconjugado de la presente invención.

El esquema N al esquema Q son cada uno un método para producir un fármaco libre de la presente invención.

[0194]

En cada paso del esquema A al esquema Q a continuación, se puede llevar a cabo una reacción deseada usando una técnica conocida de química orgánica.

El disolvente que se va a utilizar en la reacción de cada paso del esquema A al esquema Q a continuación no está limitado a un disolvente particular y puede ser cualquier disolvente que disuelva las materias primas de partida hasta cierto punto sin inhibir la reacción o tener un efecto adverso sobre la reacción.

En cada paso del esquema A al esquema Q a continuación, la temperatura de reacción depende del disolvente, las materias primas de partida, los reactivos, etc., y el tiempo de reacción depende del disolvente, las materias primas de partida, los reactivos, la temperatura de reacción, etc.

En cada paso del esquema A al esquema Q a continuación, se recolecta un compuesto objetivo utilizando un método convencional de una mezcla de reacción después de la finalización de la reacción. Por ejemplo, se neutraliza adecuadamente una mezcla de reacción; si está presente alguna materia insoluble, la materia insoluble se elimina por filtración; luego, al resultante, se agrega un disolvente orgánico inmiscible con agua, tal como acetato de etilo; se separa una capa orgánica que contiene el compuesto objetivo y se lava con agua o similar, y se seca sobre sulfato de magnesio anhidro, sulfato de sodio anhidro o similar; y el resultante se filtra y el disolvente se destiló entonces para proporcionar el producto objetivo. El producto objetivo obtenido puede someterse a separación/purificación, según sea necesario, al combinar apropiadamente métodos

convencionales, por ejemplo, métodos típicos utilizados convencionalmente para separación/purificación de compuestos orgánicos tales como recristalización, reprecipitación y cromatografía (por ejemplo, al combinar apropiadamente métodos de cromatografía de absorción en columna con un vehículo como el gel de sílice, la alúmina, un Florisil del tipo de gel de sílice y magnesio y sílice SO3H (producido por FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.); métodos con un adsorbente sintetizado, como la cromatografía de partición en columna con un vehículo como Sephadex LH-20 (producido por Pharmacia), Amberlite XAD-11 (producido por Rohm and Haas Company) y DIAION HP-20 (producido por Mitsubishi Chemical Corporation); métodos que utilizan cromatografía de intercambio iónico; métodos de cromatografía en columna de fase inversa/fase normal (preferiblemente, cromatografía líquida de alto rendimiento) con gel de sílice o gel de sílice alquilado, y eluyendo con un eluyente apropiado). En el caso de un compuesto objetivo insoluble en disolvente, un producto bruto del sólido obtenido puede lavarse con disolvente y purificarse. Se puede usar un compuesto objetivo en cada paso para la reacción posterior sin purificación.

[0195]

En cada paso del esquema A al esquema Q a continuación, J, La', Lp', B', E, V, W, $R^9$, $R^{10}$, $R^{11}$, $R^{12}$, $R^{13}$, $R^{14}$, $R^{15}$, $R^{16}$, $R^{17}$, l, $n^7$, $n^6$ y $m^1$ tienen los mismos significados que los descritos anteriormente. (Lp')' representa cualquiera de los residuos dipeptídicos de -VA -, -FG-, -PI-, -VCit-, -VK-, -(D-)PI-, -PL-, -(D-)VA-, y -GF-. Si un grupo hidroxi o un grupo amino está presente en un sustituyente de $R^{13}$, se puede usar un grupo protector para ($R^{13}$)', y si no hay un grupo protector, ($R^{13}$)' representa $R^{13}$.($R^{17}$)' representa un grupo hidroxi protegido con un grupo protector tal como un grupo terc-butildimetilsililoxi, o $R^{17}$.

[0196]

$PRO^1$, $PRO^4$, $PRO^6$, $PRO^8$ y $PRO^9$ representan cada uno un grupo protector para un grupo amino. Preferiblemente, $PRO^1$, $PRO^4$, $PRO^8$ y $PRO^9$ son cada uno, por ejemplo, un grupo aliloxicarbonilo, un grupo 2,2,2-tricloroetiloxicarbonilo, un grupo trimetilsililetoximetoxi, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo. $PRO^6$ es preferiblemente, por ejemplo, un grupo 2-(trimetilsilil)etoximetilo o un grupo metoximetilo.

$PRO^2$, $PRO^3$, $PRO^5$, $PRO^7$, $PRO^{10}$, $PRO^{11}$ y $PRO^{12}$ representan cada uno un grupo protector utilizado en el campo de la química orgánica y sintética para un grupo hidroxi, un grupo fenol y un grupo carboxilo. Preferiblemente, $PRO^2$, $PRO^3$, $PRO^5$, $PRO^7$, $PRO^{10}$, $PRO^{11}$ y $PRO^{12}$ son cada uno un grupo acetilo, un grupo bencilo, un grupo terc-butildimetilsililo (TBDMS), un grupo triisopropilsililo o un grupo terc-butilo.

[0197]

$X^2$ representa un grupo saliente utilizado en el campo de la química orgánica y sintética. Preferiblemente, $X^2$ es un átomo de cloro, un átomo de bromo, un átomo de yodo, un grupo metanosulfonilo o un grupo p-toluenosulfonilo.

$R^a$ y $R^c$ representan cada uno un sustituyente que se une a un grupo carboxilo, y es preferiblemente, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo bencilo o un grupo terc-butilo.

$R^b$ representa un grupo saliente para formar sulfonato de enol, y es preferiblemente, por ejemplo, un grupo trifluorometanosulfonilo.

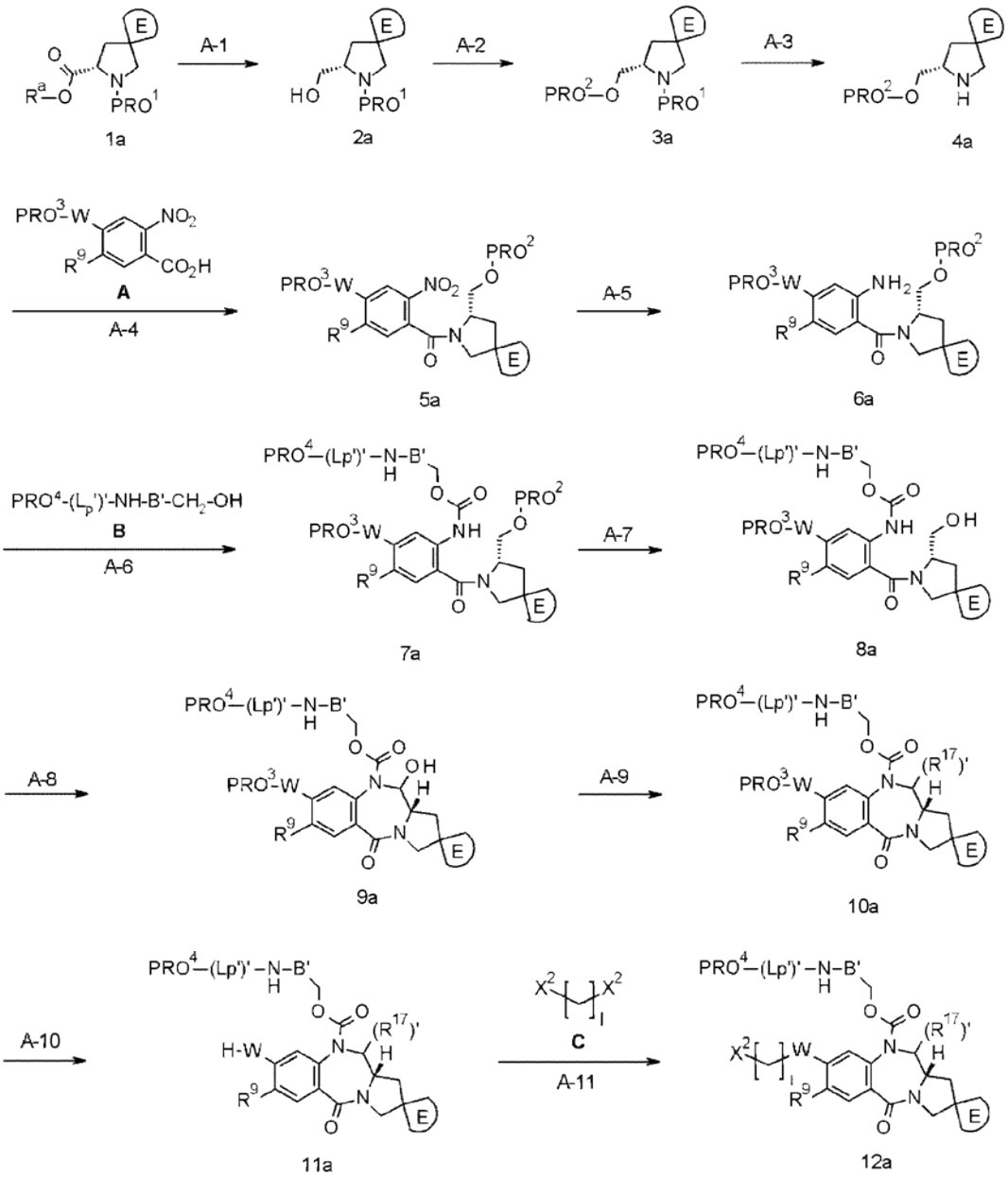
Los grupos amino y grupos hidroxi sin una descripción explícita sobre la protección en el esquema A al esquema Q pueden protegerse, según sea necesario, utilizando un grupo protector. Puede llevarse a cabo la desprotección, según sea necesario, y la protección puede ocurrir después de la desprotección para reemplazar con otro grupo protector.

[0198]

Esquema A

El método de producción es un método para producir el compuesto (12a), un intermedio sintetizado necesario para la producción del compuesto (1).

[Fórmula 103]




[0199]

Paso A-1 (1a) → (2a): Reacción de reducción

El paso se lleva a cabo al tratar el compuesto (1a) con un agente reductor (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, diborano, borohidruro de litio, borohidruro de sodio, un complejo de borano-tetrahidrofurano o hidruro de sodio y aluminio bis (2-metoxietoxi) en disolvente (éter dietílico, tetrahidrofurano (THF), diclorometano, etanol o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a -78 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles del agente reductor que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, en relación con el compuesto (1a). Según sea necesario, a la reacción se le agrega un ácido de Lewis (por ejemplo, cloruro de litio, cloruro de calcio, cloruro de estaño, un complejo de éter de trifluoruro de boro). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 60 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0200]

Paso A-2 (2a) → (3a): Introducción del grupo protector (por ejemplo, grupo terc-butildimetilsililo)

Cuando $PRO^2$ es un grupo TBDMS, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (2a) con un reactivo sililante (por ejemplo, cloruro de terc-butildimetilsililo, trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo) en disolvente (diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrafurano, N,N-dimetilformamida (DMF) o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta los 120 °C, preferiblemente a 0 °C hasta los 100 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, imidazol, piridina, 2,6-lutidina, 4-dimetilaminopiridina, hidruro de sodio). La cantidad de moles del agente sililante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 mol, en relación con el compuesto (2a), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a un cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, con respecto al compuesto (2a). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 72 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0201]

Paso A-3 (3a) → (4a): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^1$ es un grupo benciloxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al someter el compuesto (3a) a hidrogenación catalítica en disolvente (etanol, propanol, metanol, acetato de etilo, THF, 1,4-dioxano o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de un catalizador metálico de transición (por ejemplo, carbono de paladio) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. El paso se lleva a cabo normalmente bajo la atmósfera de hidrógeno; sin embargo, el ciclohexeno, el 1,4-ciclohexadieno o similares pueden usarse como donador de hidrógeno, según sea necesario. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 100 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 72 horas.

[0202]

Paso A-4 (4a) → (5a): Reacción de condensación

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (4a) y un ácido carboxílico (compuesto (A)) en disolvente (benceno, tolueno, éter dietílico, diclorometano, THF, DMF, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de un agente condensante como N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, hexafluoroborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina y cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio a -30 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de

moles del ácido carboxílico (compuesto (A)) que se va a utilizar es de 0,3 a 5 moles, preferiblemente de 0,4 a 2 moles, por mol de compuesto (4a), y la cantidad de moles del agente condensante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente 1 a 5 moles, por mol de compuesto (4a). Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, 4-dimetilaminopiridina) y un aditivo (por ejemplo, 1-hidroxibenzotriazol, 1-hidroxi-7-azabenzotriazol). La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es una cantidad catalítica a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,2 a 3 moles, por mol de compuesto (4a). La cantidad de moles del aditivo que se va a utilizar es una cantidad catalítica a una cantidad excesiva, preferiblemente de 0,01 a 3 moles, por mol de compuesto (4a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

Cuando el ácido carboxílico (compuesto (A)) se convierte en un haluro de ácido y se somete a una reacción de condensación, se lleva a cabo el paso al hacer reaccionar el compuesto (4a) y el haluro de ácido del ácido carboxílico (compuesto (A)) en disolvente (benceno, tolueno, éter dietílico, diclorometano, tetrahidrofurano, diclorometano o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, 4-dimetilaminopiridina) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente de -50 °C hasta los 100 °C. La cantidad de moles del haluro de ácido que se va a utilizar es de 0,3 moles a 5 moles, preferiblemente de 0,4 moles a 2 moles, por mol del compuesto (4a), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es una cantidad catalítica a un cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,2 a 5 moles, por mol de compuesto (4a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

Para preparar el compuesto de haluro de ácido del ácido carboxílico (compuesto (A)), el ácido carboxílico (compuesto (A)) se trata con cloruro de oxalilo, cloruro de tionilo o similares en disolvente (benceno, tolueno, diclorometano, dicloroetano o similares o un disolvente mixto de los mismos) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 100 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una cantidad catalítica de N,N-dimetilformamida o similar. La cantidad de moles de cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 10 moles, con respecto al ácido carboxílico (compuesto (A)). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0203]

Paso A-5 (5a) → (6a): Reacción de reducción

El paso se lleva a cabo al someter el compuesto (5a) a hidrogenación catalítica en disolvente (etanol, propanol, metanol, acetato de etilo, THF, 1,4-dioxano, DMF o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de un catalizador metálico de transición (carbono de paladio, níquel o similares) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. El paso se lleva a cabo comúnmente bajo la atmósfera de hidrógeno; sin embargo, se puede utilizar ciclohexeno, 1,4-ciclohexadieno, hidrazina o similares como un donador de hidrógeno. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

La reducción del grupo nitro puede llevarse a cabo en las siguientes condiciones.

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (5a) y un agente reductor (por ejemplo, hierro, zinc, cloruro de estaño) en disolvente (etanol, metanol, éter dietílico, acetato de etilo o agua, o un disolvente mixto de los mismos) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 90 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega un ácido (por ejemplo, ácido acético, ácido fórmico, cloruro de amonio). La cantidad de moles del agente reductor que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 100 moles, por mol de compuesto (5a), y la cantidad de moles del ácido que se va a agregar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles por mol de compuesto (5a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0204]

Paso A-6 (6a) $\rightarrow$ (7a): Reacción de carbamatización

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (6a) y el trifosgeno (agente isocianizante) en disolvente (THF, diclorometano, DMF o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -30 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C para generar un intermedio de isocianato en el sistema, seguido del tratamiento con un alcohol representado por la fórmula general (B). Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, carbonato de sodio, hidróxido de sodio). La cantidad de moles de trifosgeno (agente isocianizante) a utilizar es de 0,3 moles a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,35 a 3 moles, por mol de compuesto (6a), y la cantidad de moles de la base que se va a agregar es 0,5 a 5 moles por mol de compuesto (6a). El tiempo de reacción hasta que se haya formado el intermedio de isocianato es de 10 minutos a 24 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 1 hora. El tiempo de reacción para la reacción entre el intermedio de isocianato y el alcohol (B) es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 1 hora a 24 horas.

El alcohol (B) que se va a utilizar en el presente paso puede producirse de acuerdo con el esquema L descrito más adelante.

[0205]

Paso A-7 (7a) → (8a): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^2$ es un grupo TBDMS, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (7a) y cualquiera de un ácido (por ejemplo, ácido acético), un reactivo desililante (por ejemplo, piridina de ácido fluorhídrico, trietilamina de ácido fluorhídrico, un hidrofluorado, ácido fluorhídrico, tetra(n-butilamonio)fluoruro), y una mezcla del reactivo ácido y desililante en disolvente (diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, metanol, etanol, THF, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta los 100 °C, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles del ácido que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles por mol de compuesto (7a), y la cantidad de ácido o reactivo desililante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, y preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (7a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0206]

Paso A-8 (8a) → (9a): Reacción de oxidación

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (8a) y un agente oxidante (por ejemplo, una sal de clorosulfonio, un reactivo Dess-Martin, rutenato de tetrabutilamonio, clorocromato de piridinio, un catalizador de oxidación de radicales de nitroxi) en disolvente (acetona, diclorometano, piridina o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a -78 °C hasta los 30 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio) y un agente reoxidante (por ejemplo, N-óxido de N-metilmorfolina, diacetato de yodobenceno, hipoclorito de sodio) o aditivo (por ejemplo, bromuro de tetrabutilamonio, bromuro de potasio). La cantidad de moles del agente oxidante que se va a utilizar es de 0,005 moles a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,005 a 10 moles, por mol de compuesto (8a). La cantidad de moles de la base o el agente reoxidante que se va a agregar es de 1 a 10 moles por mol de compuesto (8a), y la cantidad de moles del aditivo que se va a agregar es de 0,02 a 1 mol por mol de compuesto (8a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0207]

Paso A-9 (9a) → (10a): Introducción de grupo protector

Cuando $(R^{17})'$ es un grupo terc-butildimetilsililoxi, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2.

[0208]

Paso A-10 (10a) → (11a): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^3$ es un grupo triisopropilsililo, la producción se lleva a cabo al tratar el compuesto (10a) con acetato de litio en disolvente (DMF, agua o similares, o una mezcla de los mismos) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles de acetato de litio que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (10a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0209]

Paso A-11 (11a) → (12a): Reacción de alquilación

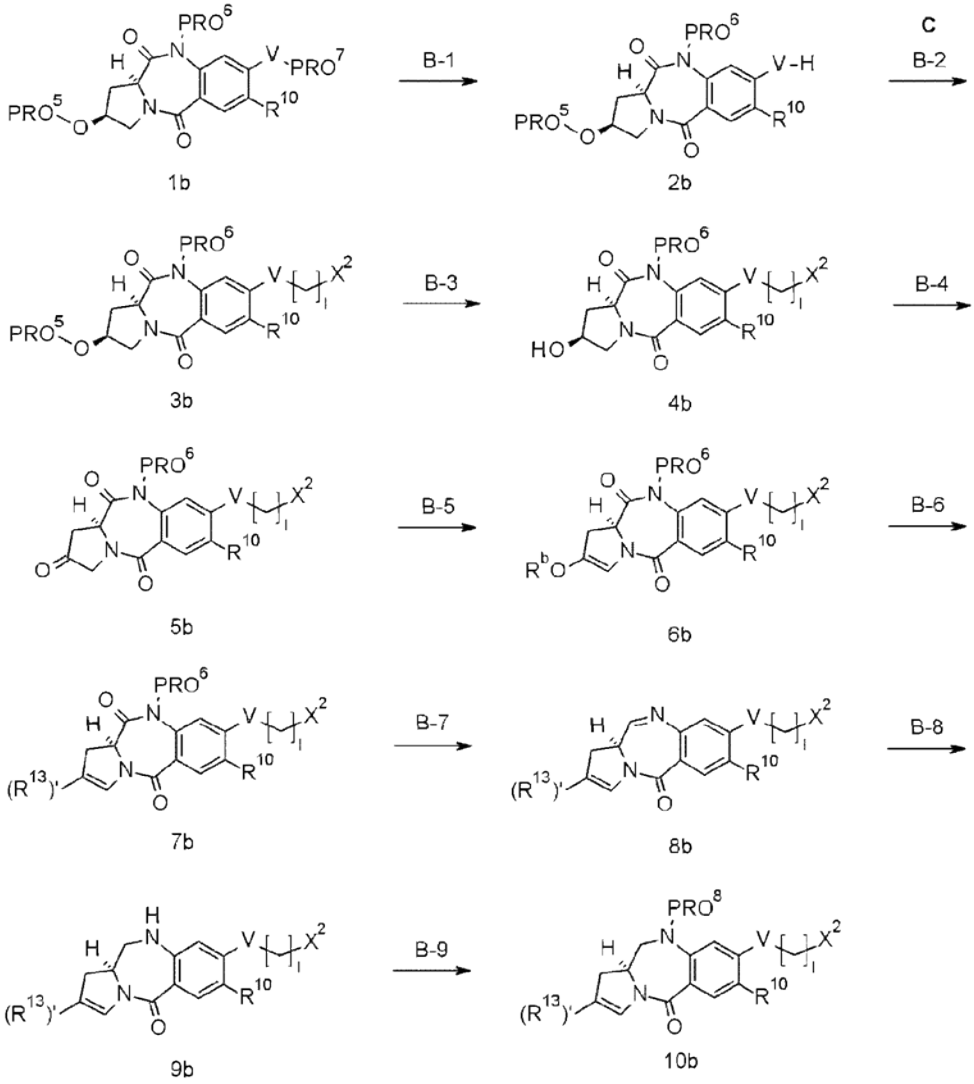
La producción se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (11a) y el agente alquilante (C) (por ejemplo, 1,5-dibromopentano, 1,3-dibromopropano) en disolvente (THF, DMF o N,N-dimetilacetamida, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta el punto de ebullición. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de cesio). La cantidad de moles del agente alquilante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (11a), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 0,4 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,5 a 5 moles, por mol de compuesto (11a). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 60 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0210]

Esquema B

El método de producción es un método para producir el compuesto (10b), un intermedio necesario para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace y $R^{14}$ y $R^{15}$ son cada uno hidrógeno.

[Fórmula 104]




[0211]

Paso B-1 (1b) → (2b): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^7$ es un grupo triisopropilsililo, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A.

Cuando $PRO^7$ es un grupo bencilo, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-3 del esquema A.

[0212]

Paso B-2 (2b) → (3b): Reacción de alquilación

La producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A.

[0213]

Paso B-3 (3b) → (4b): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^5$ es un grupo TBDMS, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A.

Cuando $PRO^5$ es un grupo acetilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (3b) y una base apropiada (por ejemplo, carbonato de potasio, metóxido de

sodio, hidróxido de sodio) en disolvente (metanol, etanol, THF, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es una cantidad catalítica a una cantidad excesiva de moles, y preferiblemente de 0,1 a 10 moles. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0214]

Paso B-4 (4b) → (5b): Reacción de oxidación

La producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A.

[0215]

Paso B-5 (5b) → (6b): Reacción de sulfonilación de enol

Cuando $R^b$ es un grupo trifluorometanosulfonilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (5b) y anhídrido trifluorometanosulfónico o similar en disolvente (por ejemplo, diclorometano) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a -78 °C hasta los 30 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, 2,6-lutidina). La cantidad de moles de anhídrido trifluorometanosulfónico que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (5b). La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a 10 moles. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 24 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 6 horas.

[0216]

Paso B-6 (6b) → (7b): Reacción de acoplamiento cruzado (por ejemplo, reacción de Suzuki-Miyaura) con catalizador metálico de transición

El paso se lleva a cabo al utilizar el compuesto (6b) y un compuesto de boro orgánico (por ejemplo, ácido 4-metoxifenilborónico) en disolvente (etanol, tolueno, 1,4-dioxano, DMF, tetrahidrafurano, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de un catalizador metálico de transición (por ejemplo, tetraquis(trifenilfosfina) paladio, diclorobis(benzonitrilo)paladio (II)) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 120 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, hidrogenocarbonato de sodio, hidróxido de sodio) o un aditivo (por ejemplo, óxido de plata, trifenlarsina).

La cantidad de moles del catalizador de paladio que se va a utilizar es de 0,01 moles a 1 mol, preferiblemente de 0,01 moles a 0,5 moles, por mol de compuesto (6b). La cantidad de moles del compuesto de boro orgánico que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 10 moles, por mol de compuesto (6b), la

cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a 5 moles por mol de compuesto (6b), y la cantidad de moles del aditivo que se va a utilizar es de 0,1 moles a 5 moles por mol de compuesto (6b). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0217]

Paso B-7 (7b) → (8b): Reacción de reducción

Cuando $PRO^6$ es un grupo 2-(trimetilsilil)etoximetilo, por ejemplo, el paso se lleva a cabo al tratar el compuesto (7b) con un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de litio, borohidruro de sodio) en disolvente (éter dietílico, THF, diclorometano, etanol o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a -78 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles del agente reductor que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 30 moles, en relación con 1 mol del compuesto (7b). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 24 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 6 horas. El compuesto (8b) puede producirse al añadir gel de sílice a una solución (diclorometano, etanol, agua o un disolvente mixto de los mismos) del producto bruto obtenido de la reacción de reducción seguido de tratamiento con agitación. El gel de sílice que se va a utilizar está en una cantidad excesiva con respecto al compuesto (7b). El tiempo de tratamiento es de 12 horas a 150 horas, y preferiblemente de 12 horas a 100 horas.

[0218]

Paso B-8 (8b) → (9b): Reducción del grupo imino

El paso se lleva a cabo al tratar el compuesto (8b) con un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de sodio, cianoborohidruro, triacetoxiborohidruro de sodio, 2-picolina borano, piridina borano) en disolvente (THF, diclorometano, N,N-dimetilforamida o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a -78 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles del agente reductor que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, en relación 1 mol del compuesto (8b). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 60 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0219]

Paso B-9 (9b) → (10b): Introducción del grupo protector

Cuando $PRO^8$ es un grupo aliloxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (9b) y cloroformiato de alilo, dicarbonato de dialilo o similares en disolvente (benceno, tolueno, piridina, éter dietílico, diclorometano, THF, 1,4-dioxano, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -30 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. Según sea

necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, piridina, carbonato de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de sodio). La cantidad de moles de cloroformiato de alilo que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 10 moles, por mol de compuesto (9b), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (9b). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 10 minutos a 48 horas.

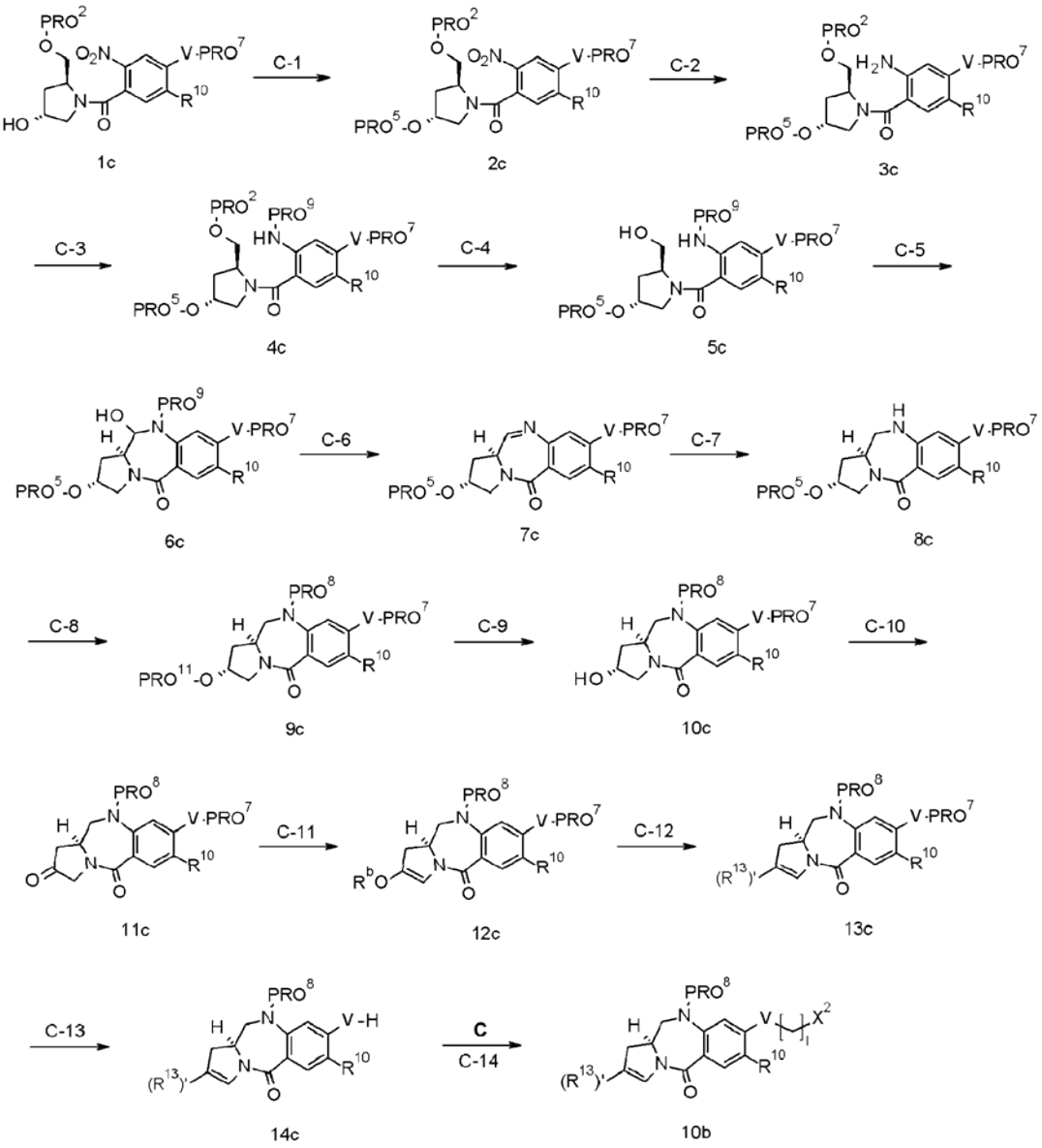
Cuando $PRO^8$ es un grupo 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (9b) y cloroformiato de 2,2,2-tricloroetilo en disolvente (benceno, tolueno, piridina, dietiléter, diclorometano, THF, 1,4-dioxano, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -30 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, piridina, carbonato de sodio, hidróxido
de sodio). La cantidad de moles de cloroformiato de 2,2,2-tricloroetilo que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 10 moles, por mol de compuesto (9b), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva, preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (9b). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 48 horas.

[0220]

Esquema C

El método de producción es un método para producir el compuesto (14c), un intermedio necesario para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace y $R^{14}$ y $R^{15}$ son cada uno hidrógeno. El compuesto (10b) puede producirse usando el método de producción.

[Fórmula 105]




[0221]

Paso C-1 (1c) → (2c): Introducción del grupo protector

Cuando $PRO^5$ es un grupo acetilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (1c) y un reactivo acetilante (por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo) en disolvente (diclorometano, DMF, piridina, THF, 1,4-dioxano o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 100 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina). La cantidad de moles del agente acetilante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 20 moles, por mol del compuesto (1c), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es una cantidad catalítica a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,1 a 20 moles, por mol de compuesto (4a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

Cuando $PRO^5$ es un grupo TBDMS, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A.

[0222]

Paso C-2 al paso C-5 y paso C-7 al paso C-14

La producción en el paso C-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso C-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso C-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, la producción en el paso C-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso C-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-8 del esquema B, la producción en el paso C-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso C-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B, la producción en el paso C-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso C-11 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-5 del esquema B, la producción en el paso C-12 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-6 del esquema B, la producción en el paso C-13 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A, y la producción en el paso C-14 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A.

[0223]

Paso C-6 (6c) → (7c): Reacción de desprotección

Cuando $PRO^9$ es un grupo 2,2,2'-tricloroetoxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (6c) y un reactivo metálico (por ejemplo, zinc, aleación de zinc y plomo, cadmio, cadmio y plomo) en disolvente (THF, ácido acético, una solución acuosa de acetato de amonio, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a 0 °C hasta los 40 °C. La cantidad de moles del reactivo metálico que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (6c). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

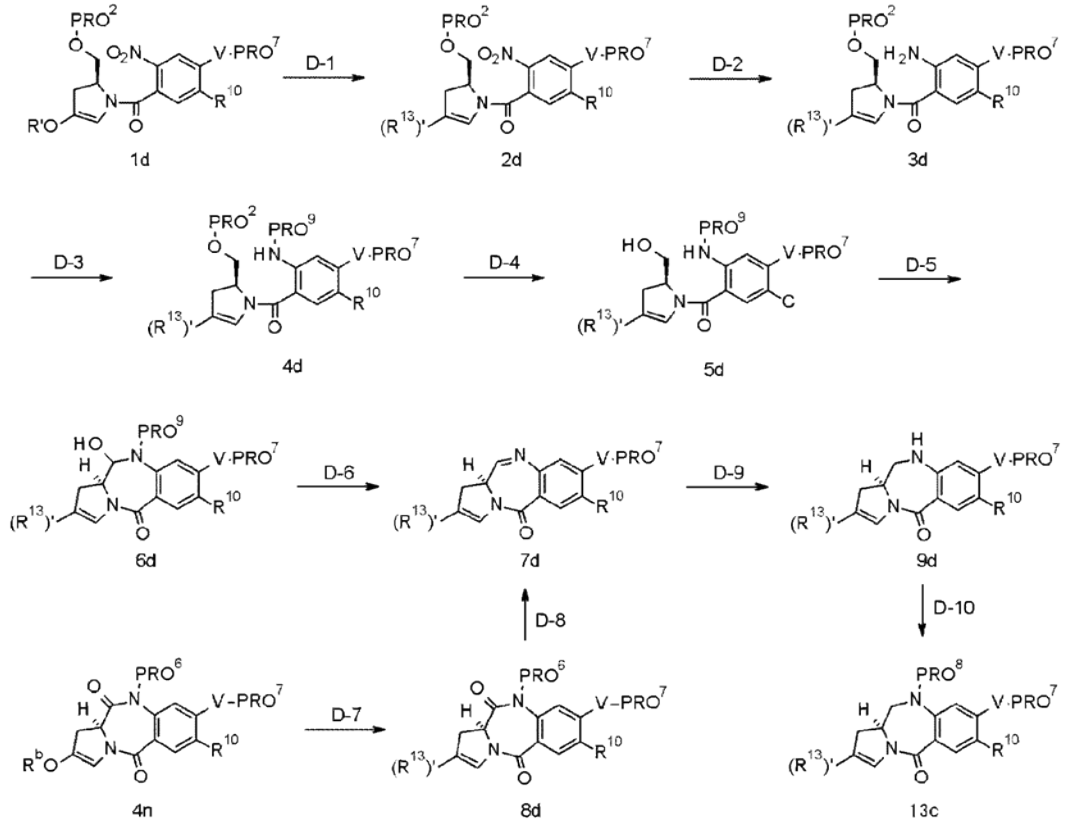
Cuando $PRO^9$ es un grupo aliloxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al utilizar el compuesto (6c), un catalizador de paladio (por ejemplo, tetrakis(trifenilfosfina)paladio) y un depurador de grupos alilo (por ejemplo, pirrolidina, morfolina, ácido barbitúrico) en disolvente (diclorometano, DMF, THF o similares, o una mezcla de los mismos) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 30 °C. La cantidad de moles del catalizador de paladio que se va a utilizar es de 0,005 moles a 1 mol, preferiblemente de 0,005 moles a 0,5 moles, por mol de compuesto (6c). La cantidad de moles del depurador de grupos alilo que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 10 moles. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0224]

Esquema D

El compuesto (13C) puede producirse con el uso del esquema.

[Fórmula 106]




[0225]

Paso D-1 al paso D-6, paso D-9 y paso D-10

La producción en el paso D-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-6 del esquema B, la producción en el paso D-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en D-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso D-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, la producción en el paso D-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso D-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C, la producción en el paso D-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-8 del esquema B, y la producción en el paso D-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B.

[0226]

Paso D-7 y paso D-8

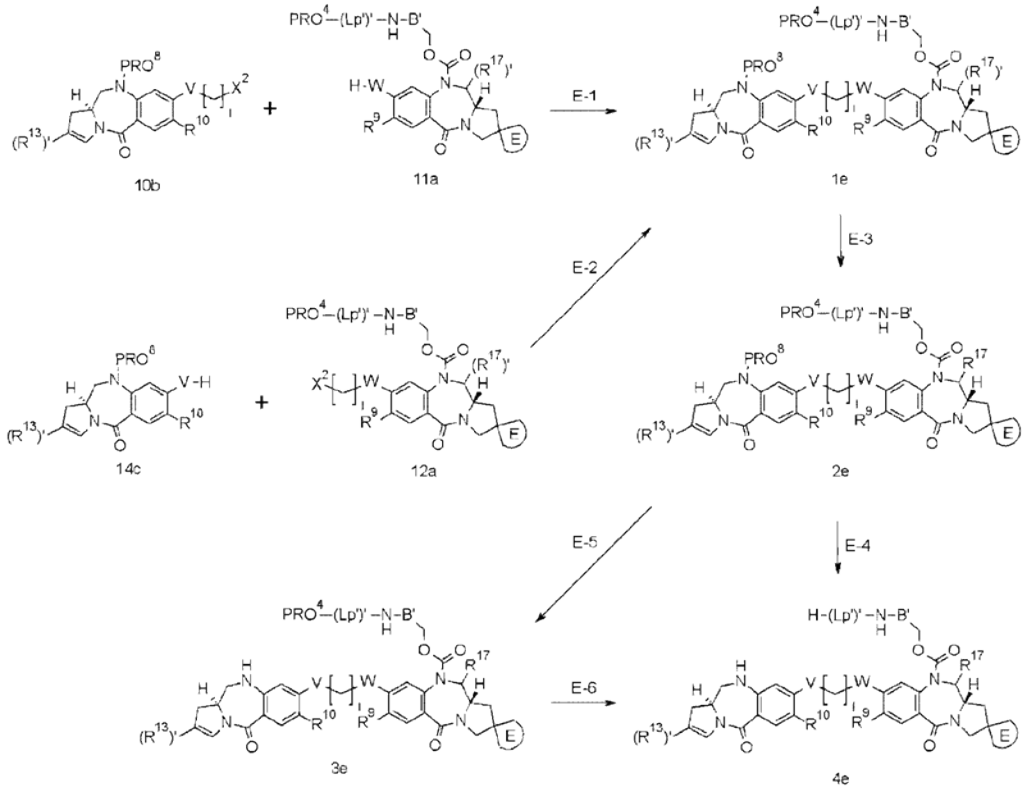
Alternativamente, el compuesto (7d) puede producirse de acuerdo con el paso D-7, que es el mismo que el paso B-6 del esquema B, y el paso D-8, que es el mismo que el paso B-7 del esquema B.

[0227]

Esquema E

El esquema E es un método para producir el compuesto (4e) al unir los compuestos (11a) y (12a) producidos en el esquema A y los compuestos (10b) y (14c) producidos en el esquema B o esquema C.

[Fórmula 107]




[0228]

Paso E-1

El paso es un paso para producir el compuesto (1e) a través de la reacción de acoplamiento del compuesto (11a) producido en el esquema A y compuesto (10b) producido en el esquema B.

La producción se lleva a cabo al someter el compuesto (11a) a una reacción de acoplamiento con el compuesto (10b) en disolvente (THF, DMF, N,N-dimetilacetamida o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de una base (por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de cesio) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles de compuesto (10b) que se va utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,7 a 1,5 moles, en relación con 0,5 moles de compuesto (11a). La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a 5 moles en relación con 0,5 moles de compuesto (11a). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 60 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0229]

Paso E-2

Alternativamente, el compuesto (1e) puede producirse al someter el compuesto (12a) producido en el esquema A y el compuesto (14c) producido en el esquema C a la reacción de acoplamiento como en el paso E-1.

[0230]

Paso E-3

La producción en el paso E-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A.

[0231]

Paso E-4

El paso es un paso para producir el compuesto (4e), cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ en el compuesto (2e) son los mismos, sometiendo el compuesto (2e) a una reacción de desprotección como en el paso C-6 del esquema C.

[0232]

Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ en el compuesto (2e) son diferentes, el compuesto (4e) puede producirse por reacción de desprotección gradual a través del paso E-5 y paso E-6.

[0233]

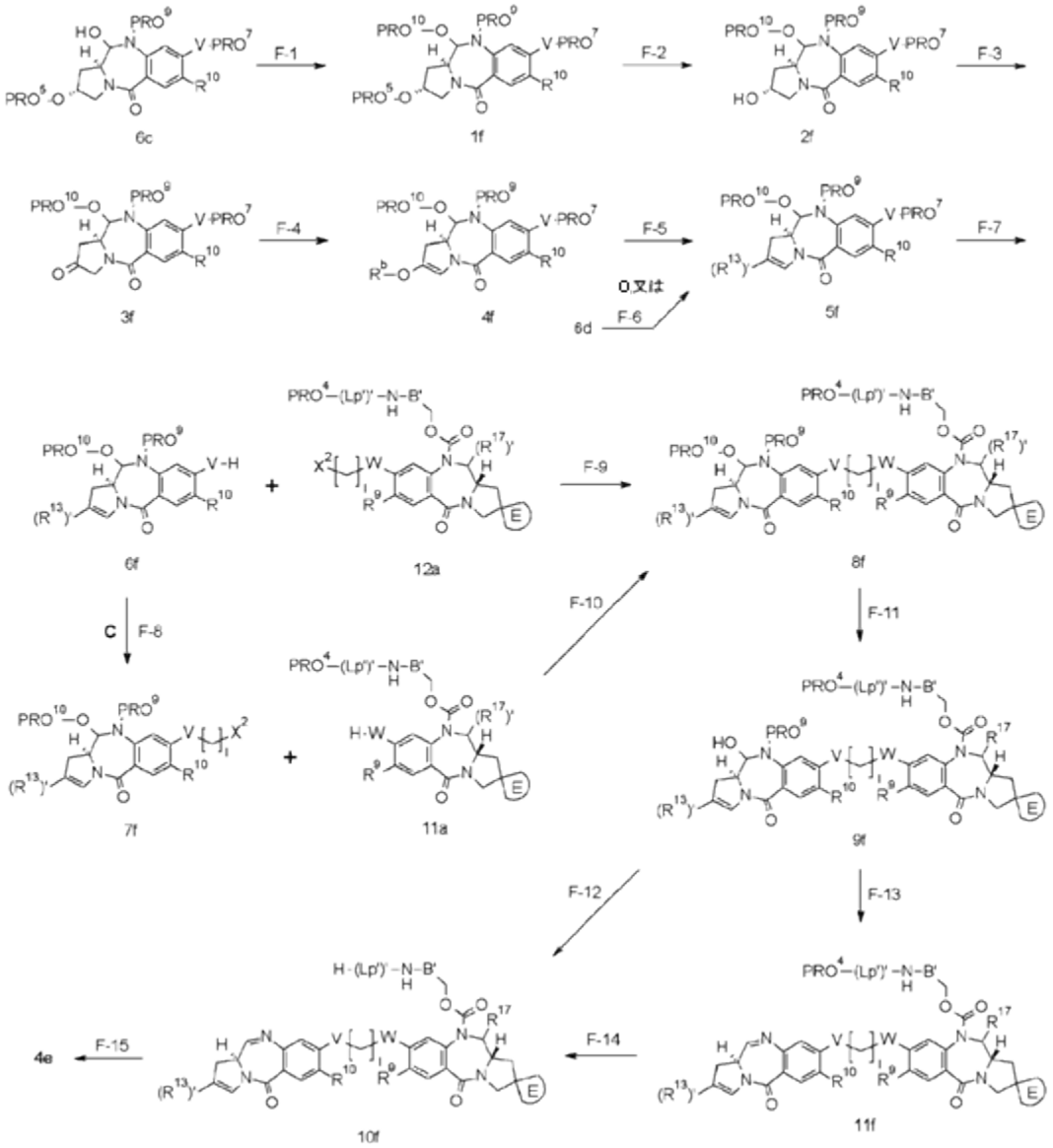
La producción en los pasos E-5 y E-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0234]

Esquema F

Alternativamente, el compuesto (4e) puede producirse a partir del compuesto intermedio (10f) en el método de síntesis. El método de producción representa un método para producir el compuesto (10f) y compuesto (4e).

[Fórmula 108]




[0235]

Paso F-1 a paso F-10, y paso F-15

La producción en el paso F-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A, la producción en el paso F-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B, la producción en el paso F-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso F-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-5 del esquema B, la producción en el paso F-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-6 del esquema B, la producción en el paso F-6 se lleva a cabo de acuerdo con el método de construcción A-2 del esquema A, la producción en el paso F-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A, la producción en el paso F-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A, la producción en el paso F-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso F-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, y la producción en el paso F-15 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-8 del esquema B.

[0236]

Paso F-11

Cuando $PRO^{10}$ y el grupo protector para el grupo hidroxi en $(R^{17})$' son cada uno un grupo TBDMS, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A.

[0237]

Paso F-12

El paso es un paso para producir el compuesto (10f), cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^9$ en el compuesto (9f) son los mismos, sometiendo el compuesto (9f) a una reacción de desprotección como en el paso C-6 del esquema C.

[0238]

Paso F-13 y paso F-14

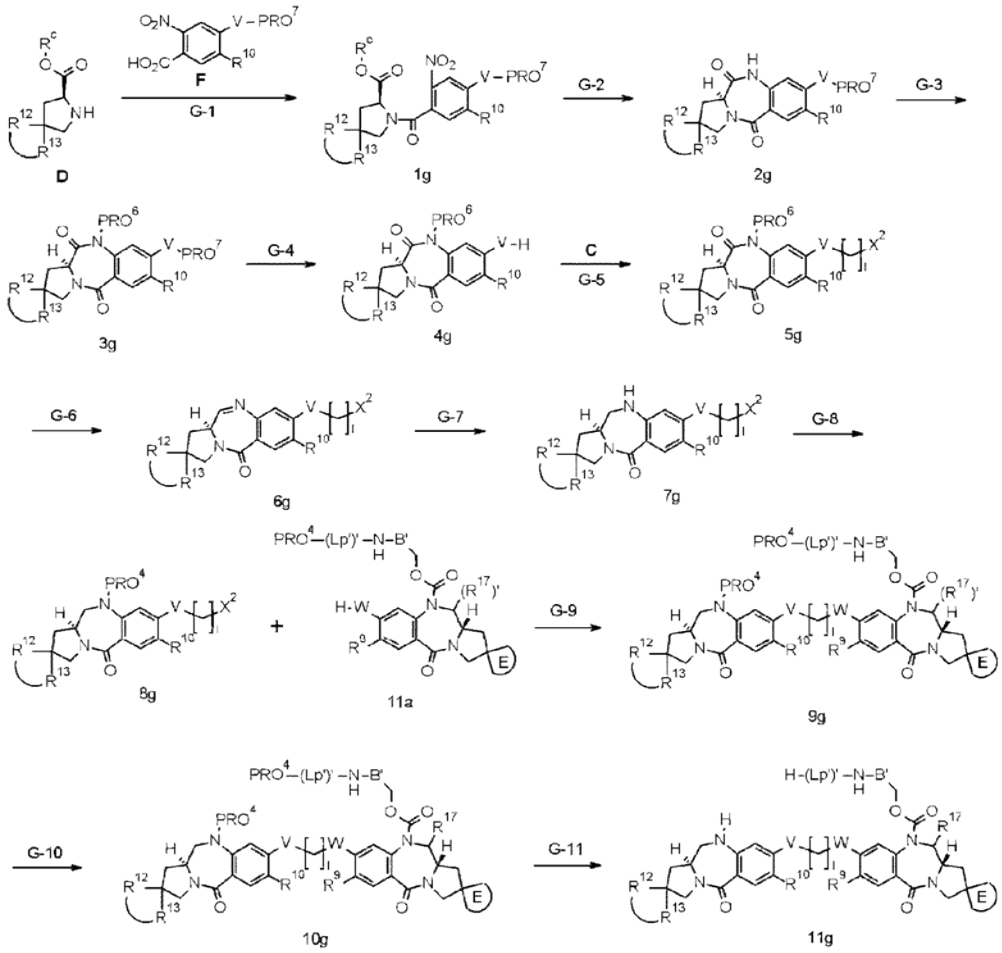
Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^9$ en el compuesto (9f) son diferentes, el compuesto (10f) puede producirse en una reacción de desprotección gradual a través del paso F-13 y paso F-14. La producción en el paso F-13 y F-14 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0239]

Esquema G

El método de producción es un método para producir el compuesto (11g), un intermedio para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo espiro, y $R^{14}$ y $R^{15}$ representan cada uno un átomo de hidrógeno.

[Fórmula 109]



[0240]

Pasos G-1 y G-2, y pasos G-5 a G-11

La producción en el paso G-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A, la producción en el paso G-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso G-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A, la producción en el paso G-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-7 del esquema B, la producción en el paso G-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-8 del esquema B, la producción en el paso G-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso G-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso G-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, y la producción en el paso G-11 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0241]

Paso G-3: Introducción del grupo protector

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (2g) y un reactivo a base de clorometoxi éter (por ejemplo, 2-clorometoxi)etiltrimetilsilano, clorometil metil éter, bencil clorometil éter) en disolvente (THF, DMF, dioxano o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -78 °C hasta el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a 0 °C

hasta los 50 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (hidruro de sodio, n-butil litio, hexametildisilazano litio). La cantidad de moles del reactivo que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (2g). La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (2g). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0242]

Paso G-4

Cuando $PRO^7$ es un grupo bencilo, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-3 del esquema A.

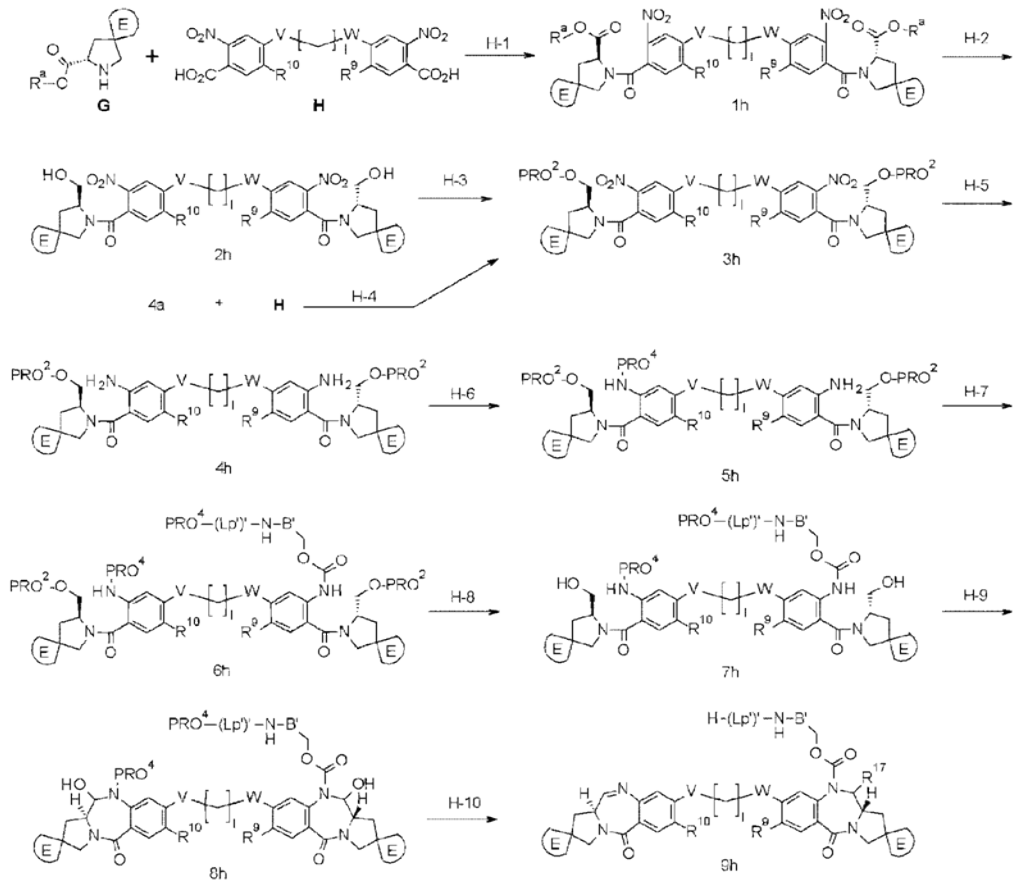
Cuando $PRO^7$ es un grupo triisopropilsililo, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A.

[0243]

Esquema H

El método de producción es un método para producir el compuesto (9h), un intermedio para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo espiro, y $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para representar un enlace imina (C=N). En el métodos de producción, el anillo espiro formado por $R^{12}$ y $R^{13}$ es sinónimo de E y, por lo tanto, está representado por E.

[Fórmula 110]



[0244]

Paso H-1 a paso H-10

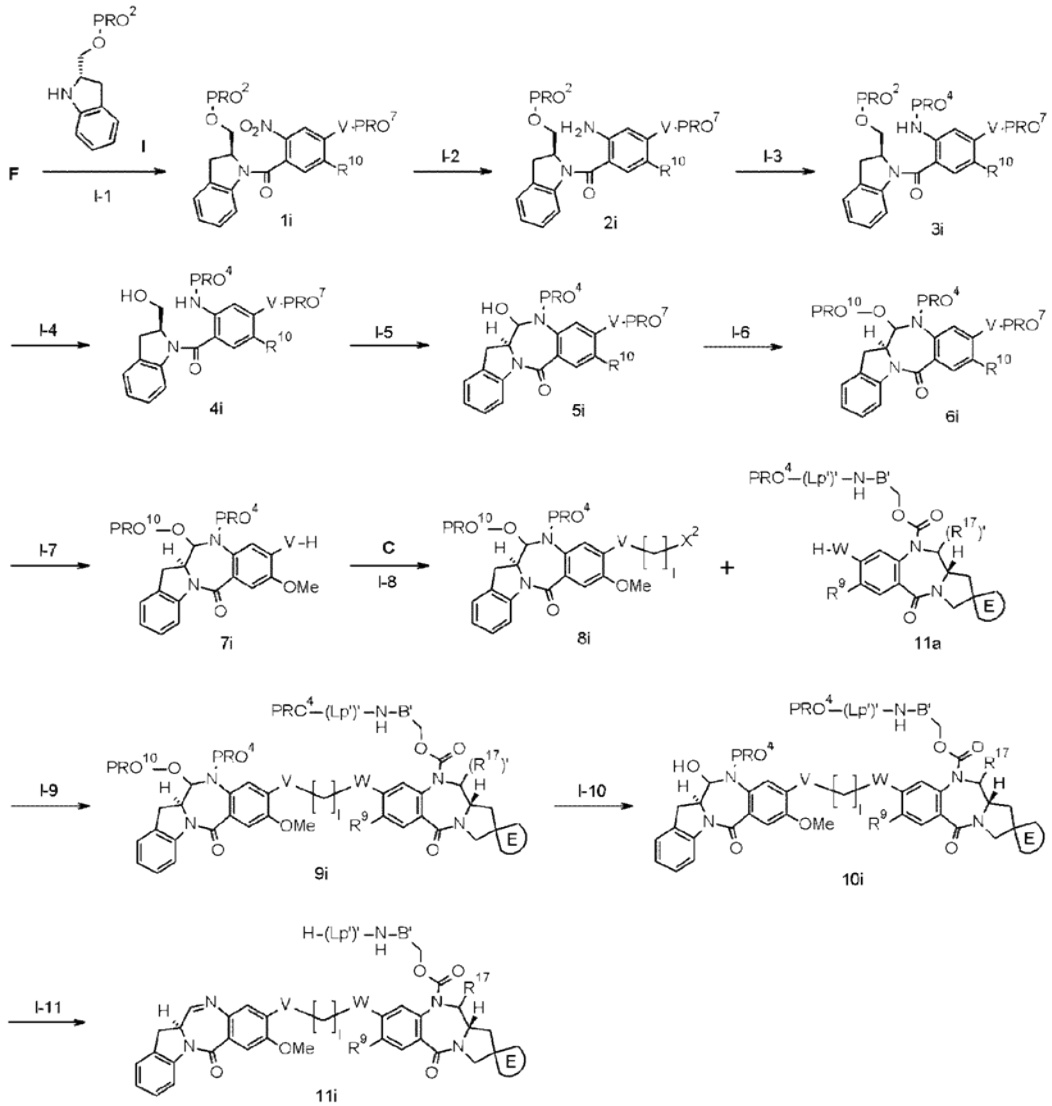
La producción en el paso H-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A, la producción en el paso H-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-1 del esquema A, la producción en el paso H-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-1 del esquema C, la producción en el paso H-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A, la producción en el paso H-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso H-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso H-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-6 del esquema A, la producción en el paso H-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B, la producción en el paso H-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, y la producción en el paso H-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0245]

Esquema I

El método de producción es un método para producir el compuesto (11i), un intermedio para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan para formar un anillo de benceno, $R^{13}$ es un enlace simple y $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para formar imina.

[Fórmula 111]



[0246]

Paso I-1 a paso I-11

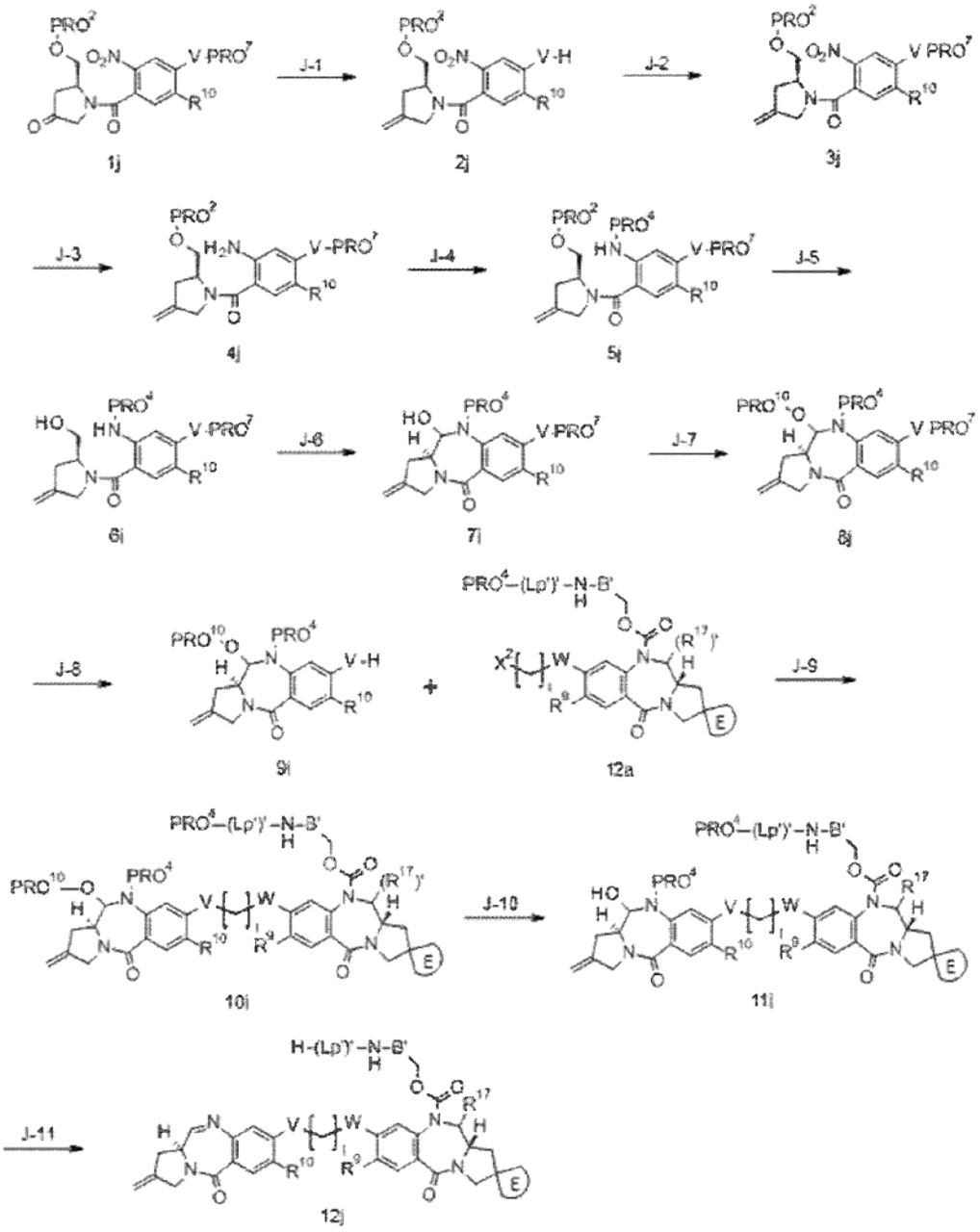
La producción en el paso I-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A, la producción en el paso I-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso I-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso I-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, la producción en el paso I-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso I-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A, la producción en el paso I-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A, la producción en el paso I-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A, la producción en el paso I-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso I-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, y la producción en el paso I-11 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0247]

Esquema J

El método de producción es un método para producir el compuesto (12j), un intermedio para producir el compuesto (1) en el que $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar $CH_2$=, $R^{11}$ es hidrógeno y $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para formar imina.

[Fórmula 112]




[0248]

Paso J-1

El paso es el paso para producir el compuesto (2j) al someter el compuesto (1j) a la reacción de Wittig.

[0249]

Paso J-2: Introducción del grupo protector

Cuando $PRO^7$ es un grupo triisopropilsililo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (2j) y un reactivo sililante (por ejemplo, cloruro de

triisopropilsililo, triflato de triisopropilsililo) en disolvente (diclorometano, acetonitrilo, THF, DMF o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta los 120 °C, preferiblemente a 0 °C hasta los 100 °C. Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, imidazol, piridina, 2,6-lutidina, 4-dimetilaminopiridina, hidruro de sodio). La cantidad de moles del agente sililante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 3 moles, por mol de compuesto (2a), y la cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (2a). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0250]

Paso J-3 a paso J-11

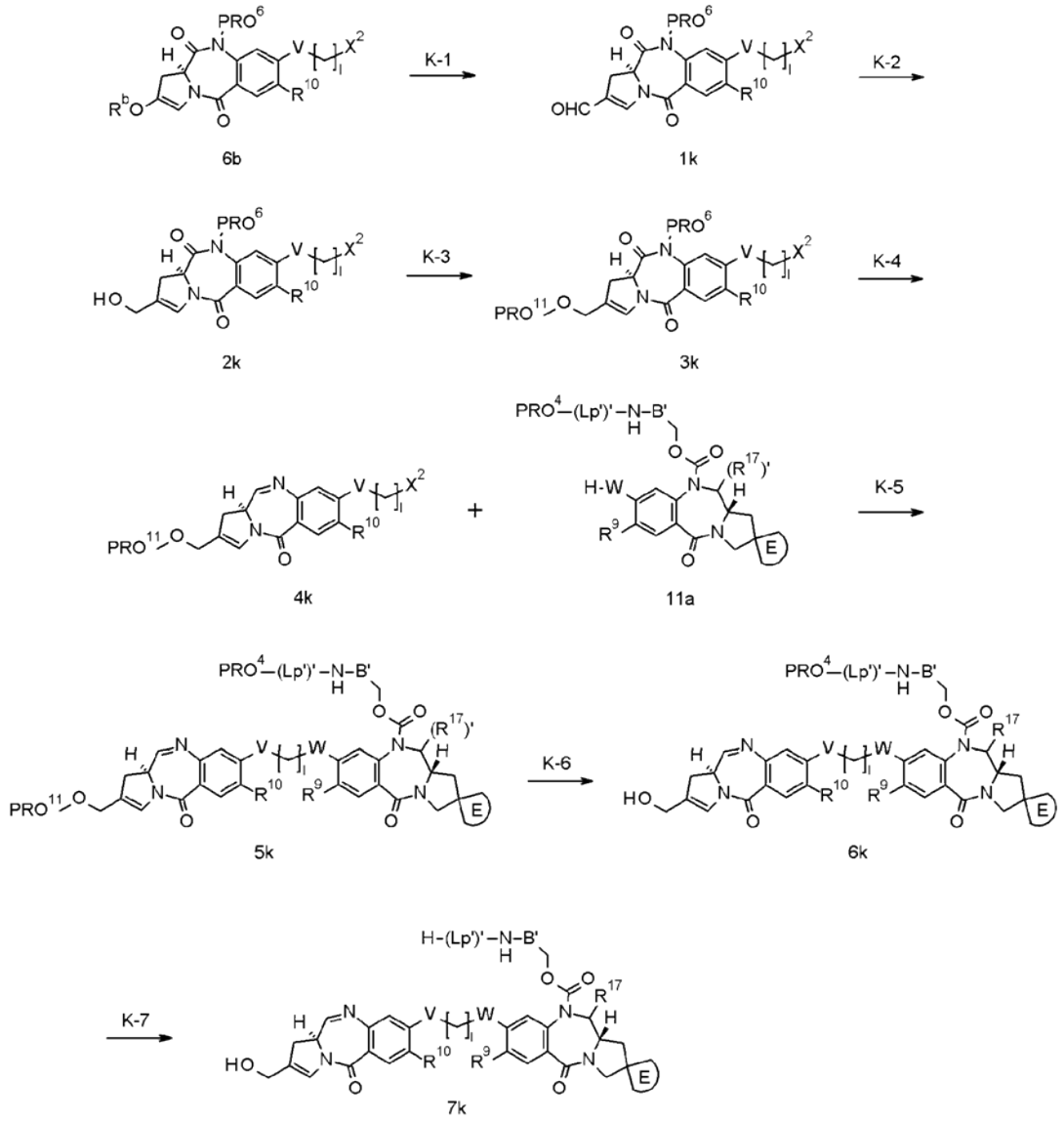
La producción en el paso J-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso J-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso J-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, la producción en el paso J-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso J-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A, la producción en el paso J-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A, la producción en el paso J-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso J-10 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, y la producción en el paso J-11 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0251]

Esquema K

El esquema K es un método para producir el compuesto (7k), un intermedio necesario para producir el compuesto (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace al mismo, $R^{13}$ es un grupo hidroximetilo, y $R^{14}$ y $R^{15}$ juntos forman imina.

[Fórmula 113]




[0252]

Paso K-1

El paso es el paso para producir el compuesto (1k) al someter el compuesto (6b) a la reacción de carbonilación.

[0253]

Paso K-2

El paso es un paso para producir el compuesto (2k) al someter el compuesto (1k) a una reacción de reducción selectiva de aldehído.

[0254]

Paso K-3 a paso K-7

La producción en el paso K-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A, la producción en el paso K-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-7 del esquema B, la producción en el paso K-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso K-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del

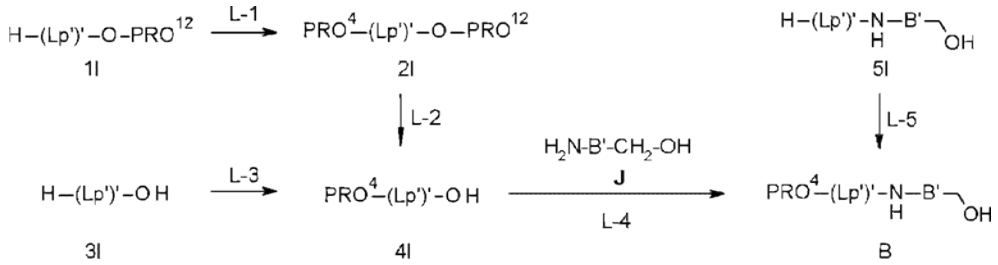
esquema A, y la producción en el paso K-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0255]

Esquema L

El esquema L es un método representativo para producir el compuesto (B).

[Fórmula 114]




[0256]

Los residuos peptídicos representados por la fórmula general (Lp')' pueden producirse a través de la reacción de condensación de aminoácidos.

$PRO^4$ protege el extremo N de los residuos peptídicos (Lp')' y $PRO^{12}$ protege el extremo C.

[0257]

Paso L-1

La producción en el paso L-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema A.

[0258]

Paso L-2: Reacción de desprotección

Cuando $PRO^{12}$ es un grupo terc-butilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (2l) y un ácido (por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido p-toluenosulfónico, ácido clorhídrico, ácido acético) en disolvente (diclorometano o similar) a 0 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 40 °C. La cantidad de moles del ácido que se va a utilizar es una cantidad catalítica a una cantidad excesiva de moles por mol de compuesto (2l). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0259]

Paso L-3 y paso L-4

La producción en el paso L-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, y la producción en el paso L-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A.

[0260]

Paso L-5

Alternativamente, el compuesto (B) puede producirse en el paso L-5 de acuerdo con el paso B-9 del esquema B.

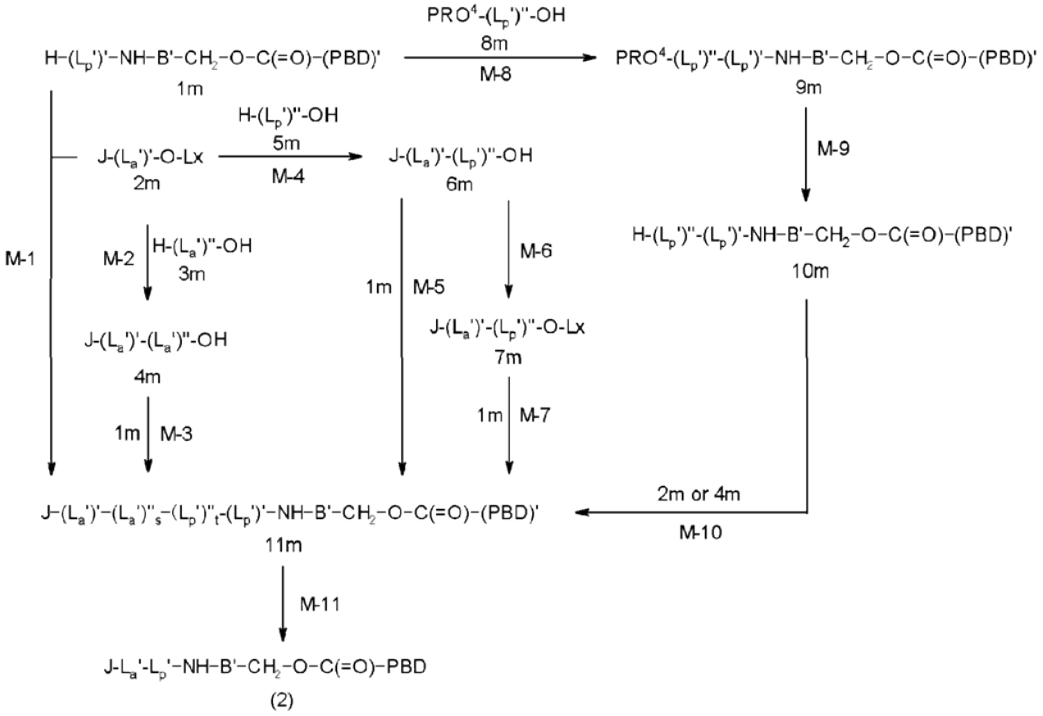
[0261]

Esquema M

El esquema M es un método para producir el compuesto (2).

El compuesto (2) que se muestra en el método de producción es sinónimo del compuesto (1) de manera que $R^{16}$ en el intermedio de producción de la presente invención es J-La'-Lp'-NH-B'-$CH_2$-O(C=O)-*.

[Fórmula 115]



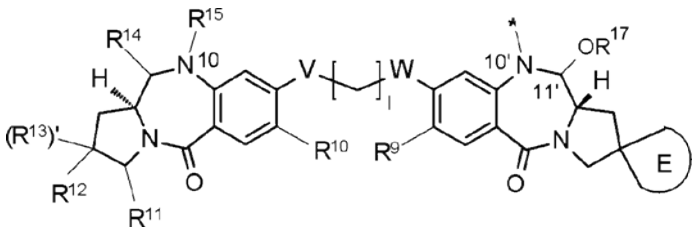

[0262]

El compuesto (1m) que se muestra en el método de producción representa el compuesto (4e), (4f), (11g), (9h), (11i), (12j), (7k) u (8k) producido en cualquiera de los esquemas E a K.

[0263]

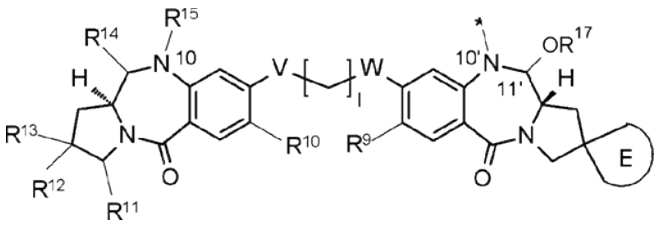
(PBD)' que se muestra en el método de producción representa:

[Fórmula 116]



y PBD representa:

[Fórmula 117]



en donde (PBD)' puede estar protegido con un sustituyente (por ejemplo, un grupo hidroxi) en $R^{13}$ en PBD, y cuando carece de un grupo protector, (PBD)' es sinónimo de PBD ($R^{13}$=($R^{13}$)').

En los residuos peptídicos representados por (Lp')''$_t$- (Lp')'' en el método de producción, un grupo funcional (por ejemplo, un grupo amino) en una cadena lateral de los residuos de aminoácidos representados por Lp' puede protegerse con un grupo protector, y cuando un grupo protector no está sustituido, (Lp')''$_t$- (Lp')' es sinónimo de Lp'.

(Lp')' representa una secuencia de aminoácidos de dos aminoácidos como se muestra a continuación, y cuando un grupo funcional (un grupo amino, un grupo hidroxi) está presente en una cadena lateral, (Lp')' puede estar protegido: -VA-, (D-)VA-, -FG-, -PI-, -VCit-, -VK-, -PL-, -(D-)P-I-, o -GF-.

(Lp')'' representa una secuencia de aminoácidos de dos a cuatro aminoácidos como se muestra a continuación, y cuando un grupo funcional (un grupo amino, un grupo hidroxi) está presente en una cadena lateral, (Lp')'' puede estar protegido:
-GG-, -EGG-, -DG-, -(D-)DG-, -EG-, -GGF-, -SG-, -KG-, -DGG-, -GGF-, -DDGG-, -KDGG-, o -GGFG-.

[0264]

(La')' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:
-C(=O)-($CH_2CH_2$)$n^6$-C(=O), -C(=O)-($CH_2CH_2$)$n^6$-NH-C(=O)-($CH_2CH_2O$)$n^7$-$CH_2CH_2$-C(=O)-, -($CH_2$)$n^8$-O-C(=O)-, -($CH_2$)$n^{12}$-C(=O)-, y
-($CH_2CH_2$)$n^{13}$-C(=O)-NH-($CH_2CH_2O$)$n^{14}$-$CH_2CH_2$-C(=O)-

[0265]

(La')'' representa a cualquiera seleccionado del siguiente grupo:
-NH-($CH_2CH_2$)$n^7$-C(=O)- y -NH-($CH_2CH_2O$)$n^7$-$CH_2$-C(=O)-, y s y t representan cada uno independientemente 0 o 1. Por ejemplo, s y t son cada uno 0 en el paso M-1, s es 1 y t es 0 en el paso M-3, y s es 0 y t es 1 en el paso M-5.

[0266]

(La')'-(La')''$_s$ es sinónimo de La'.

Cuando se tiene un grupo protector, (Lp')''$_t$-(Lp')' se convierte en Lp' por desprotección, y es sinónimo de Lp' cuando no se tiene un grupo protector.

Lx, que se muestra en el método de producción, representa un átomo de hidrógeno o un grupo saliente (por ejemplo, hidroxisuccinimida).

PBD o (PBD)' en cada uno de 1m, 9m, 10m, 11m, y el compuesto (2) que se muestra en el método de producción representan la unión en el asterisco (la posición N10') a C(=O)- en el extremo derecho de -O-C(=O)-.

[0267]

Paso M-1

El paso es un método para producir el compuesto (11m) al someter el compuesto (1m) producido en cualquiera de los esquemas E a K y el compuesto (2m) a una reacción de condensación.

Cuando Lx = H y el compuesto (2m) es un ácido carboxílico, el compuesto (2m) se puede producir de acuerdo con el paso A-4 del esquema A.

Cuando Lx es un grupo saliente (por ejemplo, hidroxisuccinimida, un grupo p-nitrofenoxi), el paso se lleva a cabo al hacier reaccionar el compuesto (1m) y el compuesto (2m) en disolvente (benceno, tolueno, éter dietílico, diclorometano, THF, DMF, metanol, agua o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -30 °C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles de compuesto (2m) que se va a utilizar es de 0,9 moles a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 0,9 a 2 moles, por mol de compuesto (1m). Según sea necesario, a la reacción se le agrega una base (por ejemplo, trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, N-metilmorfolina, 4-dimetilaminopiridina, diazabicicloundeceno). La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (1m). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 36 horas.

[0268]

Paso M-2 a paso M-5 y paso M-8

La producción en el paso M-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso M-1, la producción en el paso M-3 se lleva a cabo de acuerdo con A-4 del esquema A, la producción en el paso M-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso M-1, la producción en el paso M-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A, y la producción en el paso M-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-4 del esquema A.

[0269]

Paso M-6

El paso es un paso para producir un intermedio de éster activo (7m) al someter el compuesto (6m) a una reacción de condensación.

El paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (6m) e hidroxisuccinimida o similar en disolvente (benceno, tolueno, éter dietílico, diclorometano, THF, DMF o similares, o un disolvente mixto de los mismos) en presencia de un agente condensante como N,N-diciclohexilcarbodiimida y 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)carbodiimida a -30

°C hasta el punto de ebullición del disolvente utilizado para la reacción, preferiblemente a 0 °C hasta los 50 °C. La cantidad de moles del agente condensante que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 5 moles, por mol de compuesto (6m). La cantidad de moles de hidroxisuccinimida que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 5 moles, por mol de compuesto (6m). El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 30 minutos a 24 horas.

[0270]

Paso M-7

El paso es un paso para producir el compuesto (11m) al someter el compuesto (1m) y compuesto (7m) a una reacción de condensación como en el paso M-1.

[0271]

Paso M-9

El paso es un paso para producir el compuesto (10m) al someter el compuesto (9m) a una reacción de desprotección. Cuando $PRO^4$ es un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, el paso se lleva a cabo al hacer reaccionar el compuesto (9m) y una base (por ejemplo, 1,8-diazabiciclo[5,4,0]-7-undeceno, piperidina) en disolvente (THF, diclorometano, DMF o similares, o un disolvente mixto de los mismos) a -20 °C hasta el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a 0 °C hasta los 40 °C. La cantidad de moles de la base que se va a utilizar es de 1 mol a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 a 10 moles, por mol de compuesto (9m). El tiempo de reacción es de 1 minuto a 72 horas, y preferiblemente de 5 minutos a 24 horas.

[0272]

Paso M-10

El paso es un paso para producir el compuesto (11m) al someter el compuesto (10m) y el compuesto (2m) o (4m) a una reacción de condensación como en el paso A-4 del esquema A.

[0273]

Paso M-11

El paso es un paso para producir el compuesto (2), cuando $(Lp')''_t$- (Lp')' o PBD' en el compuesto (11m) tiene un grupo protector, desprotegiendo el compuesto (11m). La producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B y el paso C-6 del esquema C.

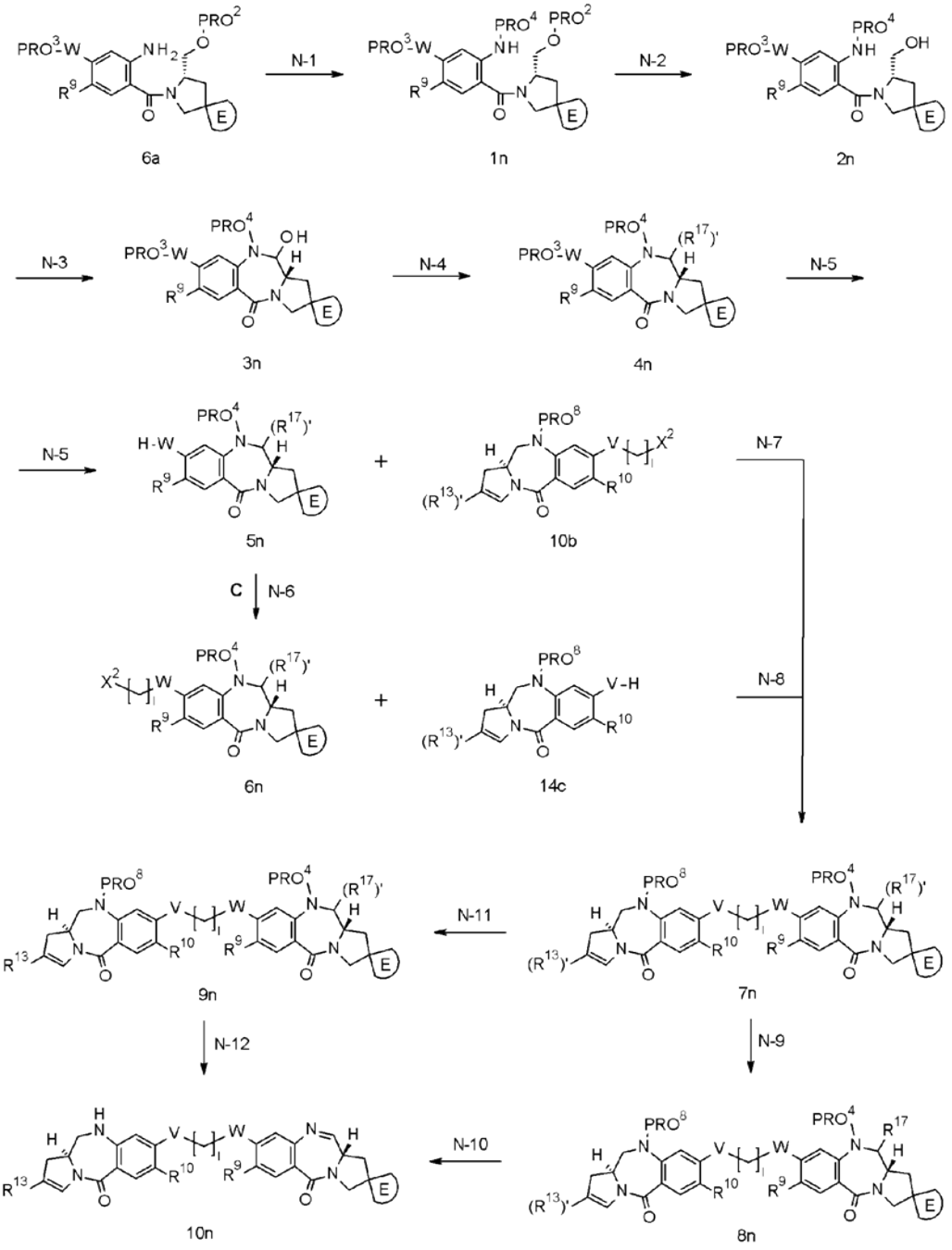
Cuando (Lp')' o PBD' no tiene grupo protector, se omite el paso M-11, y en este caso el compuesto (11m) es sinónimo del compuesto (2).

[0274]

Esquema N

El esquema N representa un método de síntesis para un compuesto, como el fármaco libre representado por (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace, $R^{14}$ y $R^{15}$ son cada uno hidrógeno y $R^{16}$ y $R^{17}$ se combinan para formar un enlace imina.

[Fórmula 118]




[0275]

Paso N-1 a paso N-8

La producción en el paso N-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso N-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, la producción en el paso N-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del

esquema A, la producción en el paso N-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-2 del esquema A, la producción en el paso N-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-10 del esquema A, la producción en el paso N-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-11 del esquema A, la producción en el paso N-7 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E y la producción en el paso N-8 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E.

[0276]

Cuando $(R^{13})'=R^{13}$, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso N-9 y el paso N-10 que se muestran a continuación.

[0277]

Paso N-9

La producción en el paso N-9 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A.

[0278]

Paso N-10

Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ son iguales, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-4 del esquema E. Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ son diferentes, la producción se lleva a cabo de acuerdo con los pasos E-5 y E-6 del esquema E.

[0279]

Cuando $(R^{13})'$ tiene un grupo protector, la producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso N-11 y el paso N-12 que se muestran a continuación.

[0280]

Paso N-11

La producción se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B.

[0281]

Paso N-12

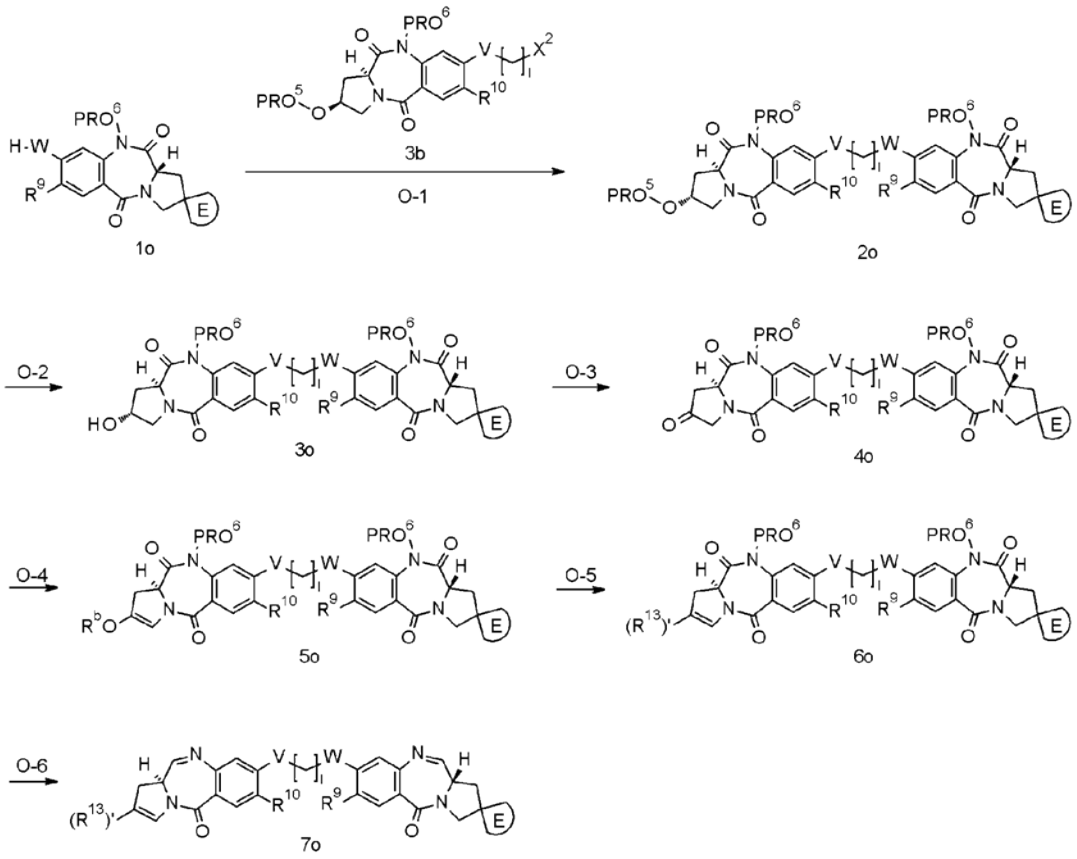
Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ son iguales, la producción se lleva a cabo de acuerdo con los pasos E-3 y E-4 del esquema E. Cuando los grupos protectores $PRO^4$ y $PRO^8$ son diferentes, la producción se lleva a cabo de acuerdo con los pasos E-3, E-5 y E-6 del esquema E.

[0282]

Esquema O

El esquema O es un método para producir el compuesto (6o), como el fármaco libre representado por (1) en el que $R^{11}$ y $R^{12}$ se combinan, junto con los átomos de carbono a los que $R^{11}$ y $R^{12}$ están unidos, para formar un doble enlace, $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para formar un enlace imina (C=N), y $R^{16}$ y $R^{17}$ juntos forman un enlace imina (C=N).

[Fórmula 119]




[0283]

Paso O-1 a paso O-6

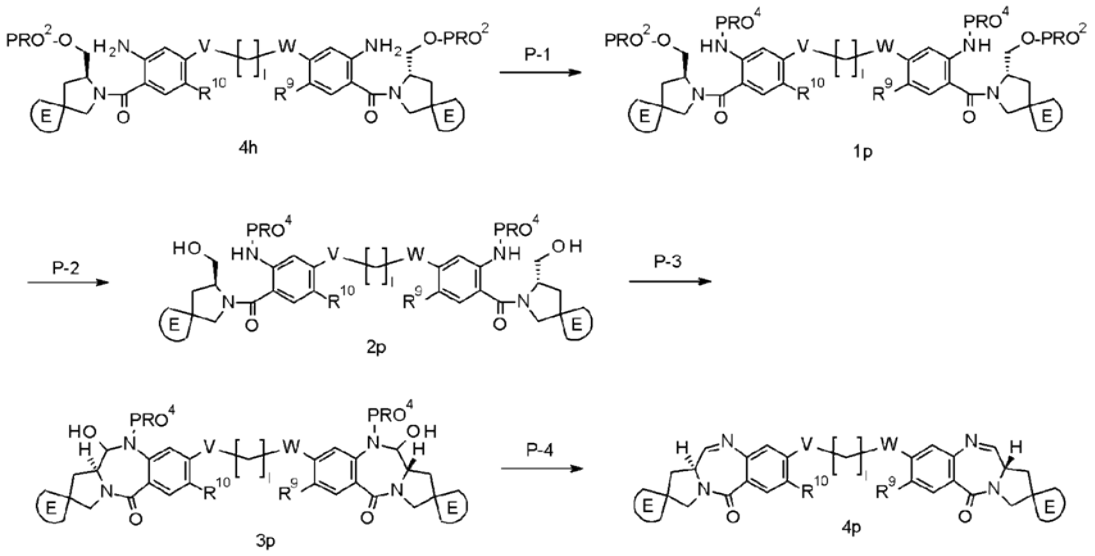
La producción en el paso O-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso O-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B, la producción en el paso O-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso O-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-5 del esquema B, la producción en el paso O-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-6 del esquema B, y la producción en el paso O-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-7 del esquema B.

[0284]

Esquema P

El método de producción es un método para producir un compuesto como el fármaco libre representado por (1) en el que $R^{11}$ representa un átomo de hidrógeno, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo espiro, $R^{14}$ y $R^{15}$ se combinan para formar un enlace imina (C=N), y $R^{16}$ y $R^{17}$ juntos forman un enlace imina (C=N). En el método de producción, el anillo espiro formado por $R^{12}$ y $R^{13}$ en el compuesto (4h) como materia prima de partida es sinónimo de E y, por lo tanto, está representado por E.

[Fórmula 120]




[0285]

Paso P-1 a paso P-4

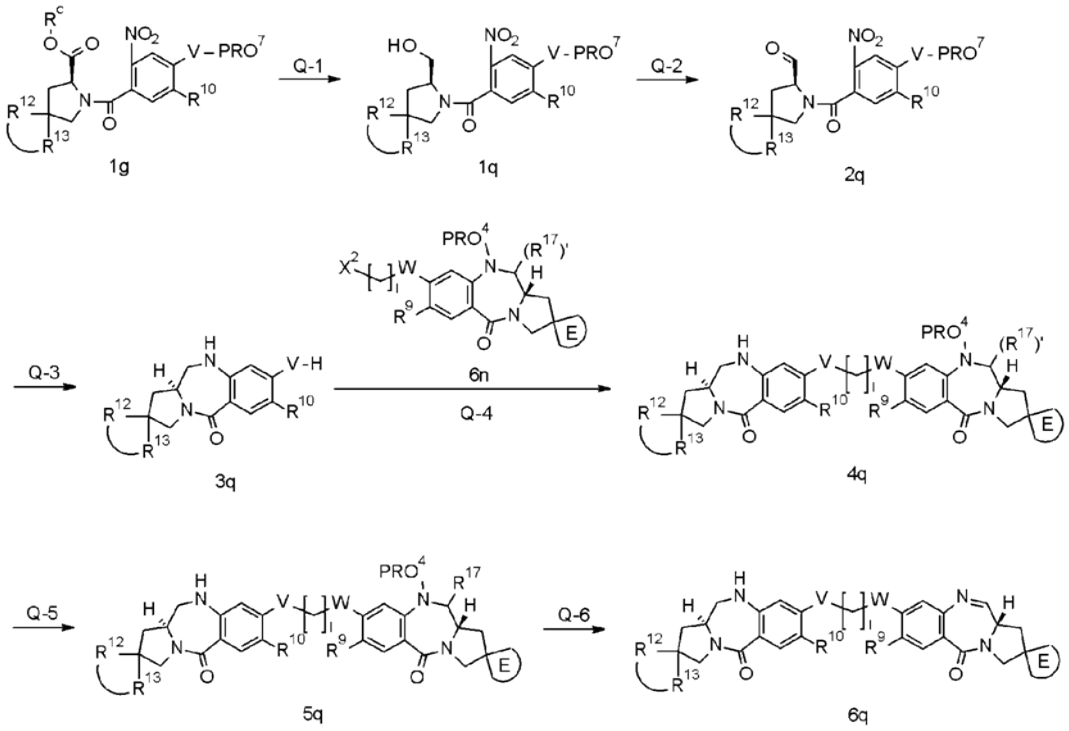
La producción en el paso P-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-9 del esquema B, la producción en el paso P-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso B-3 del esquema B, la producción en el paso P-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, y la producción en el paso P-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0286]

Esquema Q

El método de producción es un método para producir un compuesto como el fármaco libre representado por (1) en el que $R^{11}$, $R^{14}$ y $R^{15}$ representan cada uno un átomo de hidrógeno, $R^{12}$ y $R^{13}$ se combinan para formar un anillo espiro, y $R^{16}$ y $R^{17}$ se combinan para formar un enlace imina (C=N).

[Fórmula 121]




[0287]

Paso Q-1 a paso Q-6

La producción en el paso Q-1 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-1 del esquema A, la producción en el paso Q-2 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-8 del esquema A, la producción en el paso Q-3 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-5 del esquema A, la producción en el paso Q-4 se lleva a cabo de acuerdo con el paso E-1 del esquema E, la producción en el paso Q-5 se lleva a cabo de acuerdo con el paso A-7 del esquema A, y la producción en el paso Q-6 se lleva a cabo de acuerdo con el paso C-6 del esquema C.

[0288]

El grupo protector para grupos amino y grupos hidroxi opcionalmente protegidos en la descripción anterior se refiere a un grupo protector escindible con un método químico tal como hidrogenólisis, hidrólisis, electrólisis y fotólisis, y representa un grupo protector comúnmente utilizado en química orgánica y sintética (por ejemplo, véase Protective groups in Organic Synthesis, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc. (1999)).

El "grupo protector" para grupos hidroxi opcionalmente protegidos (por ejemplo, un grupo alquilcarbonilo, un grupo sililo o un grupo aralquilo), el "grupo protector" para grupos carboxilo opcionalmente protegidos (por ejemplo, un grupo alquilo C1-C6 o un grupo aralquilo), y el "grupo protector" para grupos amino opcionalmente protegidos (por ejemplo, un grupo alcoxicarbonilo) no están limitados a un grupo protector particular y pueden ser cualquier grupo protector utilizado para grupos hidroxi, grupos carboxi y grupos amino para su uso en el campo de química orgánica y sintética.

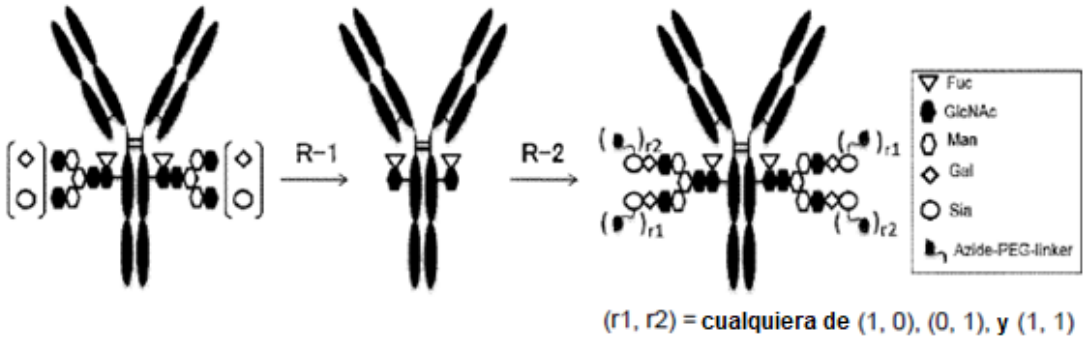
Los pasos que requieren protección o desprotección se llevan a cabo de acuerdo con cualquier método conocido (por ejemplo, un método descrito en “Protective groups in Organic Synthesis” (por Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts, 1999, publicado por Wiley-Interscience Publication)).

[0289]

Esquema R: Preparación del anticuerpo

Se puede producir un anticuerpo remodelado con glicano con el uso de un método como el que se ilustra en la Figura 3, por ejemplo, de acuerdo con un método descrito en el documento WO 2013/120066.

[Fórmula 122]




[0290]

Paso R-1: Hidrólisis del enlace glucosídico en GlcNAcβ1-4GlcNAc de la estructura de quitobiosa en el extremo reductor

El paso es un paso para preparar un anticuerpo truncado con glicano al escindir el enlace de glicano unido a N a asparagina en la posición 297 de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo objetivo (glicano unido a N297) con el uso de una reacción enzimática conocida.

Un anticuerpo objetivo (20 mg/ml) en solución tampón (por ejemplo, solución tampón de fosfato 50 mM) se somete a reacción de hidrólisis del enlace glucosídico entre GlcNAcβ1 y 4GlcNAc en la estructura de quitobiosis en el extremo reductor con el uso de hidrolasa, como la enzima EndoS a 0 °C hasta los 40 °C. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 1 hora a 6 horas. La cantidad de la enzima de tipo salvaje EndoS que se va a utilizar es de 0,1 a 10 mg, preferiblemente de 0,1 a 3 mg, a 100 mg del anticuerpo. Después de la finalización de la reacción, la purificación con cromatografía de afinidad y/o purificación con una columna de hidroxiapatita, cada una descrita más adelante, se lleva a cabo para producir un anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc con el glicano hidrolizado entre GlcNAcβ1 y 4GlcNAc.

[0291]

Paso R-2: Reacción de transglicosilación

El paso es un paso para producir un anticuerpo remodelado con glicano al unir el anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc a la forma de oxazolina del glicano de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG (en adelante, denominada como "forma de oxazolina del glicano azida") que tiene un enlazador PEG que incluye un grupo azida con el uso de reacción enzimática.

El anticuerpo truncado con glicano en solución tampón (por ejemplo, solución tampón de fosfato) se somete a una reacción de transglucosilación al hacerse reaccionar con una forma de oxazolina del glicano azida en presencia de una cantidad catalítica de transglucosidasa como EndoS (D233Q/Q303L) a 0 °C hasta los 40 °C. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 72 horas, y preferiblemente de 1 hora a 6 horas. La cantidad de la enzima EndoS (D233Q/Q303L) que se va a utilizar es de 1 a 10 mg, preferiblemente de 1 a 3 mg, a 100 mg del anticuerpo, y la cantidad de la forma de oxazolina del glicano azida que se va a utilizar es de 2 equivalentes a un equivalente excesivo, preferiblemente 2 equivalentes a 20 equivalentes.

Una vez completada la reacción, la purificación con cromatografía de afinidad y la purificación con una columna de hidroxiapatita se llevan a cabo para proporcionar un anticuerpo remodelado con glicano purificado.

La forma de oxazolina del glicano azida se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 55 a 57. Mediante el uso de una reacción conocida en el campo de la química orgánica y sintética (por ejemplo, reacción de condensación), puede introducirse $N_3$-($CH_2CH_2$-O)$n_5$-$CH_2CH_2$-$NH_2$, un enlazador PEG que incluye un grupo azida ($N_3$-L (PEG)), a MSG (MSG1, MSG2) o disialooctasacárido (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.). Específicamente, el ácido carboxílico en la posición 2 de un ácido siálico y el grupo amino en el extremo derecho de $N_3$-($CH_2CH_2$-O)$n_5$-$CH_2CH_2$-NH experimentan una reacción de condensación para formar un enlace amida.

Ejemplos del agente condensante al usar la reacción de condensación pueden incluir, entre otros, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI), carbonildiimidazol (CDI), 2-(2H-benzotriazol-2-il)-4- (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol (BOP), 1H-benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP) y O-(7-azabenzotriazol-1- il) -N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), y ejemplos del disolvente para la reacción pueden incluir, entre otros, diclorometano, DMF, THF, acetato de etilo y un disolvente mixto de los mismos.

La temperatura de reacción es normalmente de -20 °C hasta los 100 °C o el punto de ebullición del disolvente, y preferiblemente en el intervalo de -5 °C hasta los 50 °C.

Según sea necesario, se puede agregar una base orgánica como trietilamina, diisopropiletilamina, N-metilmorfolina y 4-dimetilaminopiridina o una base inorgánica como carbonato de potasio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio e

hidrogenocarbonato de sodio. Además, por ejemplo, se puede agregar 1-hidroxibenzotriazol o N-hidroxisuccinimida como acelerador de la reacción.

MSG, MSG1 o MSG2 se pueden obtener por hidrólisis del (MSG-)Asn o (MSG1-)Asn separado/purificado o (MSG2-)Asn (Ejemplo 56) con hidrolasa tal como EndoM.

La oxazolinación puede prepararse a partir de GlcNAc en el extremo reductor del glicano de tipo MSG- (MSG1-, MSG2-) o SG según un artículo conocido (J. Org Chem., 2009, 74(5), 2210-2212. Helv. Chim. Acta, 2012, 95, 1928-1936.).

[0292]

Al preparar el anticuerpo remodelado con glicano, la concentración de una solución acuosa de un anticuerpo, la medición de la concentración y el intercambio de tampón se pueden llevar a cabo de acuerdo con las operaciones comunes de A a C a continuación.

Operación común A: Concentración de solución acuosa del anticuerpo.

Se colocó una solución de un anticuerpo o fármaco inmunoconjugado en un recipiente de un Amicon Ultra (30,000 a 50,000 MWCO, Millipore Corporation), y la solución de un anticuerpo o fármaco inmunoconjugado, que se describe más adelante, se concentró a través de un operación de centrifugación (centrifugación a 2000 G a 4000 G durante 5 a 20 minutos) con el uso de una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.).

Operación común B: Medición de la concentración de anticuerpos.

La medición de la concentración de anticuerpos se llevó a cabo con el uso de un aparato de medición UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) de acuerdo con un método especificado por el fabricante. Luego, se utilizaron coeficientes de absorción de 280 nm, que son diferentes entre los anticuerpos (1,3 ml mg-1 cm-1 a 1,8 mL mg-1 cm-1).

Operación común C: Intercambio de tampones por anticuerpos

Se añadió una solución tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0), tampón fosfato (pH 6,0)) a una solución acuosa de un anticuerpo, que se concentró de acuerdo con la operación común A. Esta operación se llevó a cabo varias veces, y la concentración de anticuerpos se midió entonces con el uso de la operación común B, y se ajustó a 10 mg/ml con una solución tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0), tampón fosfato (pH 6,0)).

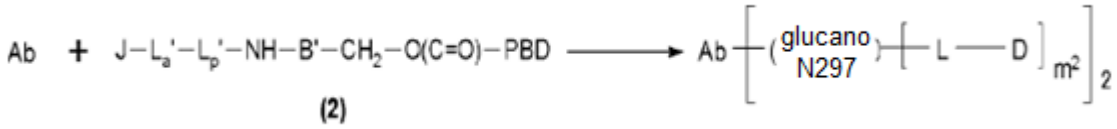
[0293]

Esquema S: Conjugación

El método de producción es un método para producir un fármaco inmunoconjugado al conjugar el anticuerpo remodelado con glicano que se describe anteriormente para el intermedio de producción (2) a través de una reacción de SPAAC (cicloadición azida-alquino promovido por tensión anular: J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 15046-15047).

En la fórmula, Ab representa el anticuerpo remodelado con glicano.

[Fórmula 123]




La reacción de SPAAC se realiza al mezclar una solución tampón (solución de acetato de sodio, fosfato de sodio, solución de borato de sodio o similares, o una mezcla de los mismos) del anticuerpo Ab y un compuesto de disolución de solución (2) en un disolvente apropiado (dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP), propilenglicol (PG) o similares, o una mezcla de los mismos).

La cantidad de moles del compuesto (2) que se va a utilizar es de 2 moles a una cantidad excesiva de moles, preferiblemente de 1 mol a 30 moles, por mol de anticuerpo, y la proporción del disolvente orgánico es preferiblemente de 1 a 200 % v/v al tampón del anticuerpo. La temperatura de reacción es de 0 °C hasta los 37 °C, y preferiblemente de 10 °C hasta los 25 °C, y el tiempo de reacción es de 1 a 150 horas, y preferiblemente de 6 horas a 100 horas. El pH en la reacción es preferiblemente de 5 a 9.

[0294]

Los compuestos del fármaco inmunoconjugado (ADC) pueden identificarse entre sí mediante el intercambio de tampones, la purificación y la medición de la concentración de anticuerpos y el número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo de acuerdo con las operaciones comunes de A a C descritas anteriormente y las operaciones comunes de D a F que se describen más adelante.

[0295]

Operación común D: Purificación del fármaco inmunoconjugado

Se equilibró una columna NAP -25 con solución tampón de ácido acético (10 mM, pH 5,5; en este documento, denominado ABS) que contiene sorbitol disponible en el mercado (5 %). A esta columna NAP-25, se aplicó una solución de reacción acuosa de un fármaco inmunoconjugado (aproximadamente 1,5 a 2,5 ml), y se eluyó con un tampón en una cantidad especificada por el fabricante para separar y recolectar una fracción de anticuerpo. La fracción separada y recolectada se aplicó nuevamente a la columna NAP-25, y se repitió dos o tres veces en total una operación de purificación por filtración en gel para elución con un tampón con el fin de proporcionar el fármaco inmunoconjugado con un enlazador de fármaco no unido, dimetilsulfóxido y propilenglicol eliminado. Según sea necesario, la concentración de la solución del fármaco inmunoconjugado se ajustó mediante las operaciones comunes de A a C.

Operación común E: Medición de la concentración de anticuerpos del fármaco inmunoconjugado

La concentración del fármaco conjugado en un fármaco inmunoconjugado se puede calcular con el uso de la ley de Lambert-Beer que se muestra a continuación. La expresión (I) que usa la ley de Lambert-Beer es la siguiente.

[Expresión 1]

$$\underset{\text{Absorbancia}}{A_{280}} = \underset{\text{Coeficiente de absorción molar}}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})} \times \underset{\text{Molaridad}}{C(mol\cdot L^{-1})} \times \underset{\text{Longitud del camino óptico}}{l(cm)} \quad \text{Expresión (I)}$$

Aquí, A280 denota la absorbancia de una solución acuosa de un fármaco inmunoconjugado a 280 nm, ε280 denota el coeficiente de absorción molar de un fármaco inmunoconjugado a 280 nm, y C (mol·L$^{-1}$) denota la molaridad de un fármaco inmunoconjugado. A partir de la expresión (I), la molaridad de un fármaco inmunoconjugado, C (mol·L$^{-1}$), puede determinarse con el uso de la expresión (II) a continuación.

[Expresión 2]

$$C(mol\cdot L^{-1}) = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})\cdot l(cm)} \quad \text{Expresión (II)}$$

Además, ambos lados se multiplican por la masa molar del fármaco inmunoconjugado, MW (g·mol$^{-1}$), para determinar la concentración en peso del fármaco inmunoconjugado, C'(mg· mL$^{-1}$) (expresión (III)).

[Expresión 3]

$$C'(mg\cdot mL^{-1}) = MW(g\cdot mol^{-1})\cdot C(mol\cdot L^{-1}) = \frac{A_{280}\cdot MW(g\cdot mol^{-1})}{\varepsilon_{280}(L\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1})\cdot l(cm)} \quad \text{Expression (III)}$$

Se describirán los valores utilizados para la expresión y aplicados a los Ejemplos.

La absorbancia A280 utilizada fue un valor medido de absorbancia UV de una solución acuosa de un fármaco inmunoconjugado a 280 nm. Para la masa molar, MW (g·mol$^{-1}$), se calculó un valor estimado del peso molecular de un anticuerpo a partir de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, y se usó como un valor aproximado de la masa molar de un fármaco inmunoconjugado. La longitud del camino óptico, l (cm), utilizada en la medición fue de 1 cm.

El coeficiente de absorción molar, ε280, del fármaco inmunoconjugado se puede determinar con el uso de la expresión (IV) a continuación.

[Expresión 4]

$$\varepsilon_{280} = \text{Absorción molar coeficiente del anticuerpo } \varepsilon_{Ab,280} + \text{Absorción molar coeficiente del fármaco } \varepsilon_{DL,280} \times \text{Número de moléculas del fármaco conjugado} \quad \text{Expresión (IV)}$$

Aquí, $\varepsilon_{Ab, 280}$ denota el coeficiente de absorción molar de un anticuerpo a 280 nm, y $\varepsilon_{DL, 280}$ denota el coeficiente de absorción molar de un fármaco a 280 nm.

Mediante el uso de un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423), $\varepsilon_{Ab, 280}$ puede calcularse a partir de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo. En los ejemplos, el coeficiente de absorción molar del trastuzumab utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$ = 215400 (valor estimado calculado). El coeficiente de absorción molar del anticuerpo CLDN6 utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$ = 221340 (valor estimado calculado), el coeficiente de absorción molar del anticuerpo TROP2 utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$ = 226400 (valor estimado calculado), el coeficiente de absorción molar del anticuerpo CD98 utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$ = 240400 (valor estimado calculado), el coeficiente de absorción molar del anticuerpo LPS utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$= 230300 (valor estimado calculado), y el coeficiente de absorción molar de la variante del trastuzumab utilizado fue de $\varepsilon_{Ab, 280}$ = 215057 (valor estimado calculado).

$\varepsilon_{DL, 280}$ se calculó para su uso a partir de un valor medido obtenido en cada medición UV. Específicamente, se midió la absorbancia de una solución que disuelve un precursor conjugado (fármaco) con una cierta molaridad, y se aplicó la expresión (I), la ley de Lambert-Beer, y se usó el valor resultante.

[0296]

Operación común F: Medición del número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado

El número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en un fármaco inmunoconjugado se puede determinar mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con el siguiente método.

[F-1. Preparación de la muestra para el análisis por HPLC (reducción del fármaco inmunoconjugado)]

Se mezcla una solución de un fármaco inmunoconjugado (aproximadamente 1 mg/ml, 60 μL) con una solución acuosa de ditiotreitol (DTT) (100 mM, 15 μL). La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 minutos para preparar una muestra en la que el enlace disulfuro entre la cadena L y la cadena H del fármaco inmunoconjugado se escinde, y esta muestra se usa para análisis por HPLC.

[F-2. Análisis por HLPC]

El análisis por HPLC se lleva a cabo en las siguientes condiciones. Sistema de HPLC: Sistema Agilent 1290 HPLC (Agilent Technologies)

Detector: Espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm, 329 nm)

Columna: BEH Fenilo (2,1 ξ 50 mm, 1,7 μm, acidez del agua) Temperatura de la columna: 75 °C

Fase móvil A: Solución acuosa de alcohol isopropílico de ácido trifluoroacético (TFA)-15 % al 0,1%

Fase móvil B: Solución de acetonitrilo de alcohol isopropílico de TFA-15 % al 0,075 %

Programa de gradiente: 14 % -36 % (0 min a 15 min), 36 % -80 % (15 min a 17 min), 80 % - 14 % (17 min a 17, 1 min), 14 % -14 % (17,1 min a 23 min)

Volumen de inyección de la muestra: 5μL

[0297]

[F-3. Análisis de datos]

[F-3-1] Una cadena L con una molécula del fármaco conjugado (cadena L con una molécula del fármaco conjugado: $L_1$) y una cadena H con una o varias moléculas del fármaco conjugado (cadena H con una molécula del fármaco conjugado: $H_1$, cadena H con dos moléculas del fármaco conjugado: $H_2$, cadena H con tres moléculas del fármaco conjugado: $H_3$) tienen hidrofobicidad aumentada en proporción al número de moléculas del fármaco conjugado y tienen un mayor tiempo de retención en comparación con la cadena L ($L_0$) y la cadena H ($H_0$) de un anticuerpo sin ninguna molécula del fármaco conjugado y, por lo tanto, $L_0$, $L_1$, $H_0$, $H_1$, $H_2$ y $H_3$ se eluyen en el orden presentado.

Si bien el orden de $L_1$ y $H_0$ se invierte en algunos casos, $H_0$, que no tiene una molécula del fármaco conjugado, no absorbe a una longitud de onda de 329 nm característica de los fármacos. Por lo tanto, $L_1$ y $H_0$ se pueden distinguir comprobando la absorción a una longitud de onda de 329 nm. Mediante la comparación del tiempo de retención entre $L_0$ y $H_0$, cada pico detectado puede asignarse a $L_0$, $L_1$, $H_0$, $H_1$, $H_2$ o $H_3$.

[F-3-2] Dado que cada enlazador de fármacos absorbe los rayos UV, los valores del área de picos se corrigen usando la siguiente expresión con los coeficientes de absorción molar de una cadena L, una cadena H y un enlazador de fármacos de acuerdo con el número de moléculas conjugadas del enlazador de fármacos.

[Expresión 5]

$$\text{Área de pico corregida de la cadena L (Li)} = \text{Área de pico} \times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena L}}{\text{Absorción molar Coeficiente de la cadena L} + \text{Nuber de moléculas del fármaco conjugado} \times \text{Coeficiente de absorción molar del enlazador del fármaco}}$$

$$\text{Área de pico corregida de la cadena H (Hi)} = \text{Área de pico} \times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena H}}{\text{Absorción molar Coeficiente de la cadena H} + \text{Nuber de moléculas del fármaco conjugado} \times \text{Coeficiente de absorción molar del enlazador del fármaco}}$$

Aquí, para los coeficientes de absorción molar (280 nm) de la cadena L y la cadena H de cada anticuerpo, se utilizan valores estimados a partir de las secuencias de aminoácidos de la cadena L y la cadena H del anticuerpo con el uso de un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). En el caso del trastuzumab, 26150 se usó como el coeficiente de absorción molar de la cadena L estimado a partir de la secuencia de aminoácidos, y 81290 se usó como el coeficiente de absorción molar de la cadena H estimado a partir de la secuencia de aminoácidos. En el caso del anticuerpo CLDN6, de manera similar, se usó 33140 como el coeficiente de absorción molar de la cadena L y 77280 como el coeficiente de absorción molar de la cadena H; en el caso del anticuerpo TROP2, se usó 26210 como el coeficiente de absorción molar de la cadena L y 68990 se usó como el coeficiente de absorción molar de la cadena H; en el caso del anticuerpo CD98, se usó 41680 como el coeficiente de absorción molar de la cadena L y 78500 como el coeficiente de absorción molar de la cadena H; en el caso del anticuerpo LPS, se usó 31710 como el coeficiente de absorción molar de la cadena L y 77470 como el coeficiente de absorción molar de la cadena H; en el caso de la variante del trastuzumab, se usó 26251 como el coeficiente de absorción molar de la cadena L y 81488 como coeficiente de absorción molar de la cadena H; y el coeficiente de absorción molar (280 nm) medido para el compuesto (1), como precursor conjugado, se usó como el coeficiente de absorción molar (280 nm) de cada enlazador de fármaco.

[F-3-3] La relación del área de picos (%) de cada cadena al total de áreas de picos corregidas se calcula con el uso de la siguiente expresión.

[Expresión 6]

$$\text{Relación del área de pico de la cadena L} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Relación del área de pico de la cadena H} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

$A_{Li}, A_{Hi}$ : $L_i, H_i$ Áreas respectivas de picos corregidos

[F-3-4] El número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo en un fármaco inmunoconjugado se calcula con el uso de la siguiente expresión.

Número promedio de moléculas del fármaco conjugado = (relación de área de pico $L_0$ x 0 + relación de área de pico $L_0$ x 1 + relación de área de pico $H_0$ x 0 + relación de área de pico $H_1$ x 1 + relación de área de pico $H_2$ x 2 + relación de área de pico $H_3$ x 3) / 100 x 2.

[0298]

<Medicamento>

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención exhibe actividad citotóxica celular para las células cancerosas y, por lo tanto, puede usarse como un medicamento, en particular, un agente terapéutico y/o agente profiláctico para el cáncer.

[0299]

Ejemplos de cánceres a los que se aplica el fármaco inmunoconjugado de la presente invención pueden incluir cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario (por ejemplo, tumor epitelial, tumor del estroma, tumor de células germinales), cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de esófago o similares, cáncer del endometrio, cáncer testicular (seminoma, no - seminoma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma placentario, tumor cerebral y cáncer de cabeza y cuello, y formas metastáticas de los mismos, pero no se limitan a ellos, siempre que las células cancerosas como objetivo terapéutico expresen proteínas reconocibles para el anticuerpo en el fármaco inmunoconjugado.

[0300]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención puede administrarse preferiblemente a mamíferos, y más preferiblemente a humanos.

[0301]

Las sustancias usadas en una composición farmacéutica que contiene el fármaco inmunoconjugado de la presente invención pueden seleccionarse adecuadamente y aplicarse a partir de aditivos de formulación o similares que generalmente se usan en el campo en vista de la dosis o concentración para administración.

[0302]

El fármaco inmunoconjugado de la presente invención puede administrarse como una composición farmacéutica que contiene uno o más componentes farmacéuticamente aplicables. Por ejemplo, la composición farmacéutica contiene comúnmente uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquido esterilizado (que incluye agua y aceite (aceite de petróleo y aceite de origen animal, de origen vegetal o sintético) (como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, y aceite de sésamo)))). El agua es un vehículo más común cuando la composición farmacéutica anterior se administra por vía intravenosa. La solución

salina, una solución acuosa de dextrosa y una solución acuosa de glicerol se pueden usar también como vehículo líquido, en particular, para una solución inyectable. Los vehículos farmacéuticos adecuados son conocidos en el arte. Si se desea, la composición anterior también puede contener una pequeña cantidad de un agente humectante, un agente emulsionante o un agente tamponador del pH. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin.

Las formulaciones corresponden al modo de administración.

[0303]

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar el fármaco inmunoconjugado de la presente invención. Ejemplos de vías de administración pueden incluir, entre otros, la intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Por ejemplo, la administración puede hacerse por inyección o inyección en bolo. De acuerdo con una realización preferida y específica, la administración de la forma del fármaco inmunoconjugado anterior se realiza mediante inyección. La administración parenteral es una ruta de administración preferida.

[0304]

Según una realización representativa, la composición farmacéutica se prescribe, como una composición farmacéutica adecuada para administración intravenosa a humanos, de acuerdo con procedimientos convencionales. La composición para administración intravenosa es comúnmente una solución en un tampón acuoso isotónico y estéril. Si es necesario, el medicamento puede contener un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de inyección (por ejemplo, lignocaína). En general, los ingredientes anteriores se proporcionan de manera individual como un polvo liofilizado seco o un concentrado anhidro contenido en cada recipiente que se obtiene al sellar en una ampolla o un sachet con indicación de la cantidad del agente activo, o como una mezcla en una forma de dosificación unitaria. Cuando la composición farmacéutica se va a administrar por inyección, se puede administrar desde una botella de inyección que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando el medicamento se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina inyectable para que los ingredientes antes mencionados se mezclen entre sí antes de la administración.

[0305]

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que contiene solo el presente fármaco inmunoconjugado, o una composición farmacéutica que contiene el fármaco inmunoconjugado y al menos un agente para el tratamiento del cáncer que no sea el fármaco inmunoconjugado. El fármaco inmunoconjugado de la presente invención puede administrarse en combinación con otros

agentes para el tratamiento del cáncer y, por lo tanto, puede potenciarse el efecto anticancerígeno. Otros agentes anticancerígenos utilizados para tal fin pueden administrarse a un individuo simultáneamente, por separado o posteriormente al fármaco inmunoconjugado, y pueden administrarse mientras se varía el intervalo de administración para cada uno. Ejemplos de dichos agentes para el tratamiento del cáncer pueden incluir abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, agentes descritos en la publicación internacional número WO 2003/038043, análogos de LH-RH (por ejemplo, leuprorelina, goserelina), fosfato de estramustina, antagonistas de estrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno) e inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, exemestano), pero no están limitados a ellos siempre que sean agentes que tengan actividad antitumoral.

[0306]

La composición farmacéutica puede formularse en una formulación de liofilización o una formulación líquida como una formulación que tiene la composición seleccionada y pureza requerida. Cuando se formula como una formulación de liofilización, puede ser una formulación que contiene aditivos de formulación adecuados que se usan en el arte. También para una formulación líquida, puede formularse como una formulación líquida que contiene diversos aditivos de formulación que se usan en el arte.

[0307]

La composición y concentración de la composición farmacéutica pueden variar dependiendo del método de administración. Sin embargo, el fármaco inmunoconjugado contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede exhibir un efecto farmacéutico incluso a una pequeña dosis cuando el fármaco inmunoconjugado tiene una mayor afinidad para un antígeno, es decir, una mayor afinidad (menor valor de Kd ) en términos de la constante de disociación (valor Kd) para el antígeno. Por lo tanto, para determinar la dosificación del fármaco inmunoconjugado, la dosificación puede establecerse en vista de la situación relacionada con la afinidad del fármaco inmunoconjugado con el antígeno. Cuando el fármaco inmunoconjugado de la presente invención se administra a un humano, por ejemplo, se pueden administrar aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg una vez o en varias porciones con intervalos de 1 a 180 días.

[0308]

El anticuerpo de la presente invención o un fragmento funcional del anticuerpo puede usarse como medicamento. En este caso, la descripción anterior del “fármaco inmunoconjugado” en el capítulo anterior <Medicamento> puede leerse apropiadamente como una descripción del “anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo”.

[0309]

Además, el fármaco libre de la presente invención (nuevo compuesto derivado de PBD), una sal del fármaco libre e hidratos de los ellos pueden usarse como medicamento.

En este caso, la descripción anterior del “fármaco inmunoconjugado” en el capítulo anterior <Medicamento> puede leerse apropiadamente como una descripción del “fármaco libre (nuevo compuesto derivado de PBD), una sal del fármaco libre e hidratos de ellos”.

Ejemplos

[0310]

La presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos que se muestran a continuación; sin embargo, la presente invención no se limita a los Ejemplos. Los ejemplos no deben interpretarse como limitación en ningún sentido. Los reactivos, disolventes y materiales de partida sin ninguna descripción en este documento pueden obtenerse fácilmente de fuentes de suministro disponibles en el mercado.

[0311]

[Ejemplo de referencia 1: Trastuzumab-tesirina

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y enlazador del fármaco

A una solución de 5 mM de trastuzumab (Ejemplo de referencia 3) en solución salina tamponada con fosfato de etilendiamina tetraacetato (pH 6,5) (9,91 mg/ml, 0,70 ml), se añadió una solución acuosa de fosfato dipotásico (1,0 M, 0,0112 ml) y una solución acuosa de clorhidrato de tris (2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,0086 ml) a 20 °C y se hicieron reaccionar a 20 °C durante 60 minutos y luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una solución de tesirina (0,36 mg) sintetizada con referencia a una literatura (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987) en dimetilacetamida (0,0415 ml) se añadió a la solución de reacción y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa de N-acetilcisteína (100 mM, 0,0024 ml) a la solución de reacción, y se hizo reaccionar durante 30 minutos para terminar la reacción.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 3,5 ml de una solución del compuesto objetivo.

Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron con el uso de las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,40 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 4,90 mg (71 %), número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo (n): 2,0

[0312]

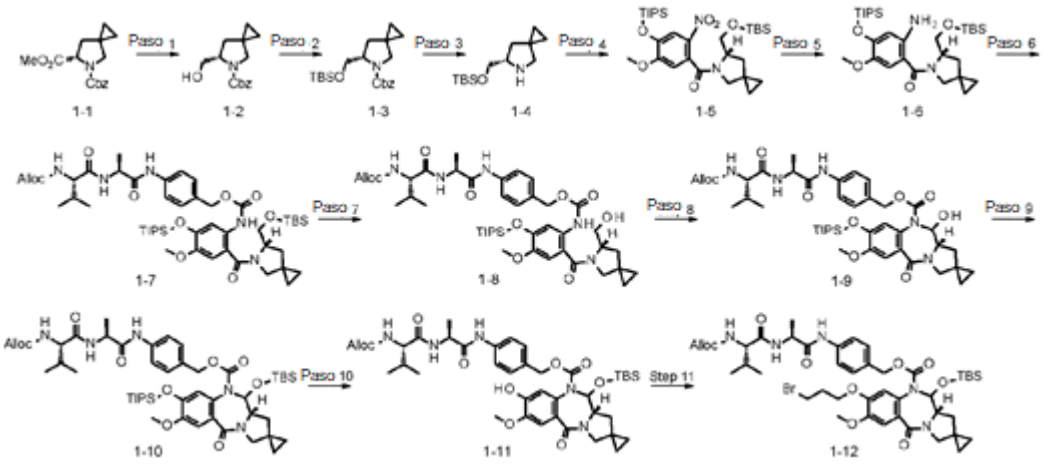
[Ejemplo de referencia 2: Anti-CLDN6 (H1L1)-tesirina

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y enlazador del fármaco

A una solución de 5 mM de un anticuerpo anti-CLDN6 (H1L1) en solución salina tamponada con fosfato de etilendiamina tetraacetato (pH 6,5) (9,87 mg/ml, 0,45 ml), se

añadió una solución acuosa de fosfato dipotásico (1,0 M, 0,0072 ml) y una solución acuosa de clorhidrato de tris (2-carboxietil)fosfina (10 mM, 0,0041 ml) a 20 °C y se hicieron reaccionar a 20 °C durante 90 minutos. Una solución de tesirina (0,15 mg) sintetizada con referencia a una literatura (Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987) en N,N-dimetilacetamida (0,0277 ml) se añadió a la solución de reacción y se hizo reaccionar a 20 °C durante 1 hora. Se añadió una solución acuosa de N-acetilcisteína (100 mM, 0,001 ml) a la solución de reacción, y se hizo reaccionar durante 30 minutos para terminar la reacción.
Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 3,5 ml de una solución del compuesto objetivo.
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron con el uso de las operaciones comunes E y F.
Concentración de anticuerpos: 1,56 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 3,90 mg (88 %), número promedio de moléculas del fármaco conjugado por molécula del anticuerpo (n): 2,1
[0313]
[Ejemplo de referencia 3: Trastuzumab de anticuerpo anti-HER2
El anticuerpo anti-HER2 se produjo con referencia al documento US 5821337. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada del trastuzumab están representadas por la SEQ ID NO: 64 y la SEQ ID NO: 65, respectivamente.
[0314]
[Ejemplo de referencia 4: Anticuerpo anti-LPS h#1G5-H1L1
El anticuerpo anti-LPS se produjo con referencia al documento WO 2015/046505. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada del h#1G5-H1L1 están representadas por la SEQ ID NO: 66 y la SEQ ID NO: 67, respectivamente.
[0315]
[Ejemplo de referencia 5: Anticuerpo anti-TROP2 hRS7
El anticuerpo anti-TROP2 se produjo con referencia a los documentos WO 2003/074566 y WO 2015/098099 (Ejemplo de referencia 1). Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada del hRS7 están representadas por la SEQ ID NO: 68 y la SEQ ID NO: 69, respectivamente.
[0316]
[Ejemplo de referencia 6: Anticuerpo anti-CD98 hM23-H1L1
El anticuerpo anti-CD98 se produjo con referencia al documento WO 2015/146132. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y cadena pesada del hM23-H1L1 están representadas por la SEQ ID NO: 70 y la SEQ ID NO: 71, respectivamente.
[0317]
[Síntesis del intermedio de producción]
Ejemplo 1: Intermedio 1

[Fórmula 124]



Paso 1: Benzil (6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro [2.4] heptano-5-carboxilato

A una solución de 5-bencilo 6-metil (6S)-5-azaspiro [2.4] heptano-5,6-dicarboxilato (104 mmol, WO 2012087596) en THF (500 ml), se añadió borohidruro de litio (4,30 g, 178 mmol) en pequeñas porciones a 0 °C.El resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos, y luego se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió agua (180 ml) y ácido clorhídrico 2 N (186 ml) a 0 °C, y el resultante se destiló a presión reducida. El residuo resultante se extrajo con acetato de etilo cuatro veces, y la capa orgánica se lavó con salmuera y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante (27,9 g, 90 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0318]

Paso 2: Benzil (6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil) -5-azaspiro [2.4] heptano-5-carboxilato

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (27,9 g, 107 mmol) y a un imidazol (14,5 g, 214 mmol) en diclorometano (300 ml), se añadió cloruro de terc-butildimetilsililo (24,2 g, 160 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución de reacción se lavó con un ácido cítrico acuoso saturado, un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se destiló luego a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100: 0 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (32,5 g, 81 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,39-7,34(5H,m),5,23-5,11(2H,m),4,10-3,48(4H,m),3,16-3,14(1H,m),2,15-2,04(1H,m),1,81-1,77(1H,m),0,91-0,88(9H,m),0,65-0,55(4H,m),0,08-0,01(6H,m).

MS(APCI)m/z:376$(M+H)^+$

[0319]

Paso 3: (6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro [2.4] heptano

A una solución del compuesto obtenido en el paso 2 (32,5 g, 86,5 mmol) en etanol (400 ml), se añadió catalizador de carbono de paladio al 7,5 % (contenido de humedad: 54 %, 5,00 g) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó bajo la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 6 horas. La solución de reacción se filtró a través de un Celite, y el filtrado se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (21,3 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:3,79-3,77(1H,m),3,71-3,69(1H,m),3,65-3,60(1H,m),3,01-2,98(2H,m),1,81-1,71(2H,m),0,90(9H,s),0,65-0,57(4H,m),0,08(3H,s),0,07(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:242$(M+H)^+$

[0320]

Paso 4: [(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro [2.4] hept-5-il] (5-metoxi-2-nitro-4-{[tri(propan-2-il) silil]oxi}fenil)metanona

A una solución de ácido benzoico de 5-metoxi-2-nitro-4-{tri(propan-2-il)silil]oxi} (522 g, 141 mmol, US 20150283262) y a un monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (23,8 g, 155 mmol) en diclorometano (500 ml), se añadió N, N'-diciclohexilcarbodiimida (35,0 g, 170 mmol) con enfriamiento con hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de que el ácido carboxílico desapareció, se añadió lentamente gota a gota a la misma una solución del compuesto obtenido en el paso 3 (34,1 g, 141 mmol) y una trietilamina (29,4 ml, 212 mmol) en diclorometano (100 ml). Después de que la solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se añadió hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado a la mezcla de reacción, y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida, y al residuo resultante se añadieron acetato de etilo y éter dietílico, y los contenidos sólidos se eliminaron por filtración, y el filtrado se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (55,0 g, 66 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,72-7,66(1H,m),6,80-6,73(1H,m),4,53-4,49(1H,m),4,04-3,95(1H,m),3,91-3,88(3H,m),3,59-3,54(1H,m),3,36-3,25(0,5H,m),3,01-2,96(1,5H,m),2,24-2,20(0,3H,m),2,09-2,05(0,7H,m),2,00-1,97(0,7H,m),1,69-1,67(0,3H,m),1,32-1,24(3H,m),1,12-1,05(18H,m),0,93-0,91(6H,m),0,79-0,77(3H,m),0,71-0,62(2H,m),0,57-0,40(2H,m),0,12-0,10(4H,m),0,11-0,15(2H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:593$(M+H)^+$

[0321]

Paso 5: (2-amino-5-metoxi-4-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil) [(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro [2.4] hept-5-il]metanona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 4 (55,0 g, 92,8 mmol) en etanol (300 mL), se agregó carbono de paladio al 7,5 % (10,0 g) bajo la atmósfera de nitrógeno. El globo de nitrógeno se reemplazó inmediatamente con un globo de hidrógeno, y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente con la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (52,2 g, 100 %), que se usó directamente para la reacción posterior.

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:6,71(1H,s),6,25(1H,s),4,55-4,28(2H,m),3,97(1H,m),3,75-3,62(3H,m),3,70(3H,s),3,09-3,07(1H,m),2,24-2,19(1H,m),1,81-1,68(1H,m),1,27-1,22(3H,m),1,09-1,05(18H,m),0,90(9H,s),0,65-0,46(4H,m),0,07-0,03(6H,m). MS(APCI, ESI)m/z:563$(M+H)^+$

[0322]

Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil)]oxi}metil) -5-azaspiro [2.4] hept-5-il] carbonil}-4-metoxi-5-{[tri (propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil) fenil]-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 5 (18,6 g, 33,0 mmol) y a una trietilamina (6,26 ml, 45,2 mmol) en THF (300 ml), se añadió lentamente trifosgeno (4,22 g, 14,2 mmol) en un baño de hielo de etanol. Después de la adición, a la mezcla de reacción enfriada con hielo, se añadió lentamente gota a gota una solución mixta de N-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4- (hidroximetil)fenil]-L-alaninamida (11,4 g, 30,2 mmol, WO 2011130598) y trietilamina (6,26 ml, 45,2 mmol) en THF (100 ml) y N,N-dimetilformamida (30 ml). Después de la adición gota a gota, se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a 40 °C. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 40:60 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (23,5 g, 74 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,99(1H,m),8,58(1H,s),7,80(1H,s),7,55-7,53(2H,m),7,34-7,32(2H,m),6,77-6,75(2H,m),5,94-5,87(1H,m),5,40-5,38(1H,m),5,33-5,29(1H,m),5,23-5,21(1H,m),5,13(1H,m),5,10(2H,m),4,69-4,64(1H,m),4,62-4,52(2H,m),4,06-4,03(1H,m),3,98(1H,m),3,76-3,65(6H,m),3,04(1H,m),2,28-2,26(1H,m),2,18-2,13(1H,m),1,46(3H,m),1,32-1,25(3H,m),1,11-1,09(18H,m),0,99-0,84(15H,m),0,65-

0,40(4H,m),0,08-0,00(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:966$(M+H)^+$

[0323]

Paso 7: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro [2.4] hept-5-il] carbonil}-4-metoxi-5-{[tri (propan-2-il)silil]oxi}fenil) carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 6 (23,5 g, 24,3 mmol en THF (50 ml), a un metanol (50 ml) y a agua (44 ml), se añadió ácido acético (200 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (18,0 g, 87 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,64-8,62(1H,m),8,50(1H,m),7,69(1H,m),7,55-7,53(2H,m),7,34-7,32(2H,m),6,79-6,75(3H,m),5,91-5,89(1H,m),5,39(1H,m),5,32-5,29(1H,m),5,23-5,21(1H,m),4,68-4,54(4H,m),4,31(1H,m),4,06-4,04(1H,m),3,81-3,79(3H,m),3,76(3H,s),3,63-3,61(1H,m),3,13-3,11(1H,m),2,16-2,13(1H,m),1,87-1,81(2H,m),1,46-1,43(3H,m),1,30-1,24(3H,m),1,12-1,08(18H,m),0,98-0,91(6H,m),0,63-0,45(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:852$(M+H)^+$

[0324]

Paso 8: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2, 1-c] [1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución de dimetilsulfóxido (3,75 ml, 52,8 mmol) en diclorometano (300 ml), se añadió lentamente gota a gota cloruro de oxalilo (2,17 ml, 25,3 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a -78 °C. Después de la adición gota a gota, la mezcla de reacción se agitó a -78 °C. Se añadió lentamente a la mezcla de reacción una solución del compuesto obtenido en el paso 7 (18,0 g, 21,1 mmol) en diclorometano (50,0 ml). Se añadió trietilamina (14,6 ml, 105 mmol) a la solución de reacción a -78 °C. Después de la adición, se retiró el baño del refrigerante y la temperatura se elevó lentamente a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (200 ml). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó

mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:60 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (16,5 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,51-8,36(1H,m),7,54-7,38(2H,m),7,22-7,07(3H,m),6,73-6,64(1H,m),5,94-5,87(2H,m),5,33-5,22(3H,m),5,09(1H,m),4,97(1H,m),4,64-4,58(4H,m),4,02-4,00(1H,m),3,86-3,83(3H,m),3,75-3,70(1H,m),3,61-3,54(2H,m),3,38-3,29(1H,m),2,40(1H,m),2,16-2,14(1H,m),1,74-1,71(1H,m),1,44(3H,m),1,18-1,16(3H,m),1,05-1,00(18H,m),0,97-0,92(6H,m),0,72-0,60(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:850$(M+H)^+$

[0325]

Paso 9: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-valil-N-{4- [({[(11a'S)-11'- [terc-butil (dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri (propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida.

A una solución del compuesto obtenido en el paso 8 (12,0 g, 14,1 mmol) y 2,6-lutidina (6,58 ml, 56,5 mmol) en diclorometano (200 ml), se añadido lentamente gota a gota trifluorometilsulfonato de terc-butildimetilsililo (9,73 ml, 42,3 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a 0 °C. Después de agitar con enfriamiento con hielo durante 10 minutos, se retiró el baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (8,12 g, 60 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,67-8,45(1H,m),7,50-7,44(2H,m),7,19(1H,s),7,13(2H,m),6,95(2H,m),6,62-6,57(2H,m),6,01(1H,m),5,95-5,86(1H,m),5,33-5,13(3H,m),4,82(1H,m),4,65-4,54(3H,m),4,03-4,01(1H,m),3,84-3,82(3H,m),3,73-3,66(1H,m),3,50-3,48(1H,m),3,27(1H,m),2,37-2,33(1H,m),2,19-2,13(1H,m),1,54-1,43(3H,m),1,22-1,13(3H,m),1,10-1,00(18H,m),0,97-0,91(6H,m),0,81(9H,s),0,76-0,59(4H,m),0,19--0,09(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:964$(M+H)^+$

[0326]

Paso 10: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-valil-N-{4- [({[(11a'S)-11'-{[terc-butil (dimetil) silil] oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H- espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil} oxi) metil] fenil} -L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 9 (8,12 g, 8,42 mmol) en N,N-dimetilformamida (90 ml) y a agua (2 ml), se añadió acetato de litio (0,611 g, 9,26 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (5,48 g, 81%).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,76-8,60(1H,m),8,02-7,56(1H,m),7,45-7,44(2H,m),7,21(1H,s),7,10-7,09(2H,m),6,81-6,74(1H,m),6,65(1H,s),6,23(1H,s),6,01-5,99(1H,m),5,95-5,84(1H,m),5,41-5,20(2H,m),5,16(1H,m),4,84(1H,m),4,67-4,54(4H,m),4,05-4,03(1H,m),3,87(3H,s),3,71(1H,m),3,55-3,51(1H,m),3,26(1H,m),2,35(1H,m),2,18-2,12(1H,m),1,55-1,42(3H,m),0,97-0,92(6H,m),0,81(9H,s),0,76-0,61(4H,m),0,20--0,06(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:808$(M+H)^+$

[0327]

Paso 11: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-8'-(3-bromopropoxi)-11'-{[terc-butil (dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-11', 11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (2,40 g, 2,97 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (2,73 g, 99 %).

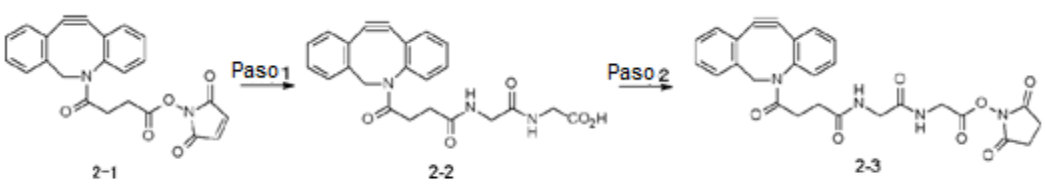
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,01-9,86(1H,m),8,24-8,04(2H,m),7,64-7,54(2H,m),7,32-7,14(4H,m),6,59-6,48(1H,m),5,94-5,88(2H,m),5,32-4,76(5H,m),4,44-4,38(3H,m),3,87-3,81(5H,m),3,64-3,55(2H,m),3,41(1H,m),3,14(1H,m),2,45-2,09(4H,m),1,97-1,94(1H,m),1,44-1,30(4H,m),0,89-0,53(9H,m),0,79(9H,s),0,13-0,06(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:930[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],928[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0328]

Ejemplo 2: Intermedio 2

[Fórmula 125]




Paso 1: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo [b,f]azocin-5 (6H)-il) -4-oxobutanoil]glicilglicina

A una mezcla de glicilglicina (0,328 g, 2,49 mmol), a una N,N-diisopropiletilamina (0,433 mL, 2,49 mmol) y a una N,N-dimetilformamida (20 mL), se añadió 1-{[4-(11,12-didehidrodibenzo [b,f] azocin-5(6H)-il) -4-oxobutanoil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (1,00 g, 2,49 mmol, Click Chemistry Tools) y agua (10 mL) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,930 g , 89 %). CMA se refiere a una capa orgánica para distribución con cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v).

$^{1}$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:12,58(1H,s),8,14-8,12(1H,m),8,08-8,07(1H,m),7,69-7,68(1H,m),7,62-7,61(1H,m),7,53-7,45(3H,m),7,40-7,29(3H,m),5,05-5,01(1H,m),3,73-3,72(2H,m),3,66-3,60(3H,m),2,66-2,60(1H,m),2,33-2,24(1H,m),2,08-2,04(1H,m),1,81-1,77(1H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:420[$(M+H)^+$].

[0329]

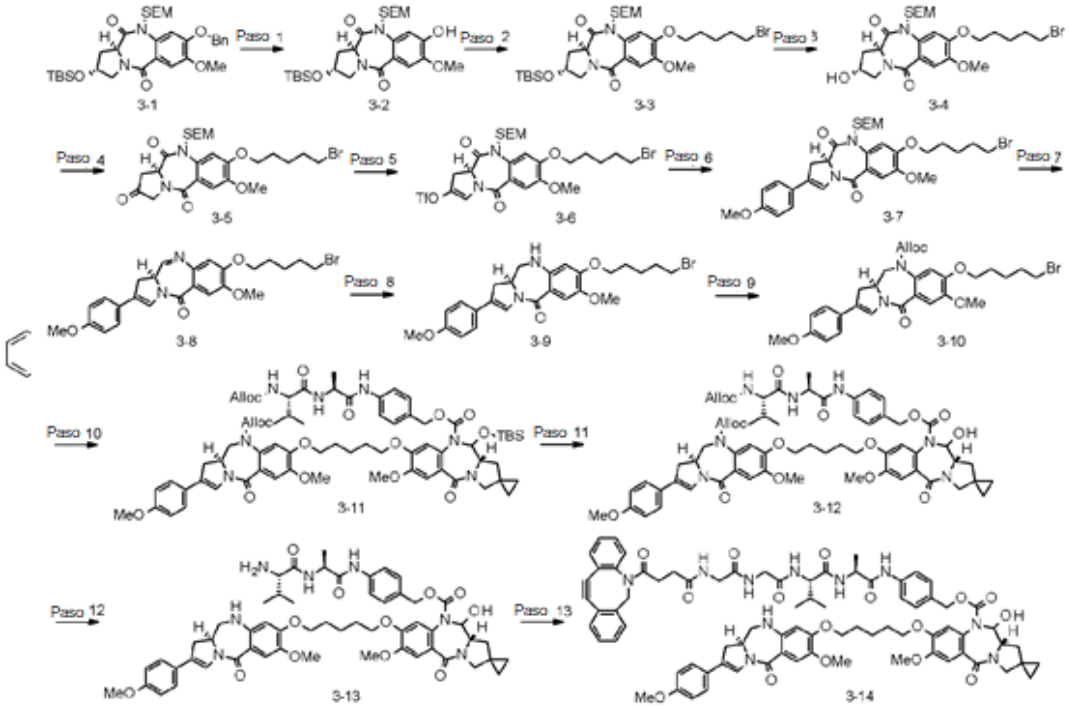
Paso 2: 2,5-Dioxopirrolidin-1-il N-[4-(11,12-didehidrodibenzo [b,f] azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]glicilato glicilo

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (0,612 g, 1,46 mmol) y a una N-hidroxisuccinimida (0,168 g, 1,459 mmol) en diclorometano (6 ml), se añadió clorhidrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (0,420 g, 2,19 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,375 g, 50 %). CMA se refiere a una capa orgánica para distribución con cloroformo: metanol: agua = 7:3:1 (v/v/v).

[0330]

Ejemplo 3: Enlazador de fármaco 1

[Fórmula 126]




Paso 1: (2R,11aS)-2-{[terc-butil (dimetil) silil] oxi} -8-hidroxi-7-metoxi-10-{[2-(trimetilsilil) etoxi] metil} -2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin- 5,11 (10H,11aH)-diona

A una solución de (2R,11aS)-8-(benciloxi)-2- {[terc-butil (dimetil) silil] oxi}-7-metoxi-10-{[2- (trimetilsilil) etoxi] metil}-2,3-dihidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5,11 (10H,11aH)-diona (25,5 g, 41,6 mmol, WO 2016149546) en THF (150 ml) y al etanol (150 ml), se añadió 5 % de carbono de paladio (contenido de humedad: 54 %, 10,0 g) bajo atmósfera de nitrógeno, y la solución de reacción se agitó entonces bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió cloroformo a la solución de reacción, que se filtró a través de un Celite, y el filtrado luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 100: 0 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (19,4 g, 89 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,36(1H,s),7,25(1H,s),6,01(1H,s),5,45-5,43(1H,m),4,69-4,67(1H,m),4,60-4,55(1H,m),4,23-4,21(1H,m),3,96(3H,s),3,76-3,68(2H,m),3,63-3,61(1H,m),3,56-3,53(1H,m),2,88-2,83(1H,m),2,03-2,00(1H,m),1,00-0,98(2H,m),0,87(9H,s),0,10(6H,s),0,02(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:523$(M+H)^+$

[0331]

Paso 2: (2R,11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-2-{[terc-butil (dimetil)silil]oxi}-7-metoxi-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi] metil}-2,3-dihidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5,11 (10H,11aH)-diona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (10,8 g, 20,7 mmol) en N,N-dimetilformamida (30 mL), se añadión 1,5-dibromopentano (23,8 g, 103 mmol) y carbonato de potasio (3,43 g, 24,8 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas, se añadió agua a la solución de reacción, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio, y se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (14,5 g, cuantitativo).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,34(1H,s),7,21(1H,s),5,52-5,49(1H,m),4,63-4,62(1H,m),4,58-4,55(1H,m),4,24-4,22(1H,m),4,07-4,04(2H,m),3,92(3H,s),3,82-3,64(3H,m),3,56-3,53(1H,m),3,45-3,43(2H,m),2,86-2,84(1H,m),2,04-2,00(1H,m),1,97-1,87(4H,m),1,66-1,62(2H,m),1,01-0,98(2H,m),0,87(9H,s),0,10(6H,s),0,04(9H,s). MS(APCI, ESI)m/z:673[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],671[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0332]

Paso 3: (2R,11aS)-8-(5-Bromopentil) oxi] -2-hidroxi-7-metoxi-10-{[2-(trimetilsilil) etoxi] metil} -2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin- 5,11 (10H,11aH)-diona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 2 (21,5 mmol) en THF (40 ml), se añadió una solución de THF de 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (28,0 ml, 28,0 mmol) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió agua a la solución de reacción, que se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica obtenida se lavó con salmuera. El resultante se secó sobre sulfato de sodio y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 97,5: 2,5 (v/v) a 92,5:7,5 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (11,3 g, 94 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,34(1H,s),7,21(1H,s),5,53-5,50(1H,m),4,69-4,64(2H,m),4,32-4,30(1H,m),4,10-4,00(2H,m),3,91(3H,s),3,88-3,75(2H,m),3,73-3,64(2H,m),3,45-3,44(2H,m),2,99-2,96(1H,m),2,15-2,09(1H,m),1,99-1,85(5H,m),1,68-1,62(2H,m),1,01-0,95(2H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:559[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],557[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0333]

Paso 4: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-10-{[2- (trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-2,5,11 (3H,10H,11aH)-triona

El compuesto obtenido en el paso 3 (11,3 g, 20,2 mmol), el bromuro de tetrabutilamonio (0,325 g, 1,01 mmol) y el bromuro de potasio (0,240 g, 2,02 mmol) se disolvieron en un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (60 ml)/diclorometano (60 ml), a los que se añadió nor-AZADO (0,0279 g, 0,202 mmol) e hipoclorito de sodio

pentahidratado (2,03 g, 27,2 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos. Debido a que las materias primas permanecieron, se añadió hipoclorito de sodio pentahidratado (1,00 g, 13,4 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a 0 °C durante 15 minutos. Se añadió además al mismo hipoclorito de sodio pentahidratado (0,300 g, 4,03 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a 0 °C durante 15 minutos, y la desaparición de las materias primas se confirmó por TLC. Se añadió una solución acuosa de tiosulfato de sodio a la solución de reacción, que se extrajo con cloroformo, y la capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 75:25 (v/v) a 40:60 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (9,74 g, 87 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,33(1H,s),7,24(1H,s),5,56-5,53(1H,m),4,71-4,69(1H,m),4,66-4,63(1H,m),4,27-4,22(1H,m),4,12-4,02(2H,m),3,93-3,88(4H,m),3,82-3,75(1H,m),3,69-3,67(1H,m),3,61-3,56(1H,m),3,46-3,44(2H,m),2,82-2,77(1H,m),1,97-1,89(4H,m),1,68-1,64(2H,m),1,05-0,93(2H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:557[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],555[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0334]

Paso 5: Trifluorometanosulfonato de (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-5,11-dioxo-10 -{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil} -5,10,11,11a-tetrahidro-1H -pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-2-ilo

A una solución del compuesto obtenido en el paso 4 (9,74 g, 17,5 mmol) en diclorometano (160 ml), se añadió 2,6-lutidina (8,17 ml, 70,1 mmol) a -40 °C y el resultante se agitó a -40 °C durante 10 minutos. Se añadió ácido trifluorometanosulfónico anhidro (8,85 ml, 52,6 mmol) a la solución de reacción a -40 °C, y el resultante se agitó a -40 °C durante 30 minutos. A la solución de reacción, se añadió una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico, que se extrajo con cloroformo, y la capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 95:5 (v/v) a 70:35 (v/v)] y luego se purificó mediante cromatografía de gel de sílice NH2 [hexano: acetato de etilo = 95:5 (v/v) a 65:35 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (7,10 g, 59 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,32(1H,s),7,24(1H,s),7,15-7,14(1H,m),5,56-5,53(1H,m),4,70-4,68(1H,m),4,66-4,63(1H,m),4,11-4,01(2H,m),3,94-3,90(4H,m),3,84-3,75(1H,m),3,73-3,68(1H,m),3,46-3,44(2H,m),3,18-3,14(1H,m),1,96-1,88(4H,m),1,69-1,61(2H,m),1,02-0,92(2H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:689[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],687[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0335]

Paso 6: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil} -1H-pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepin-5,11(10H, 11aH)-diona

A una mezcla del compuesto obtenido en el paso 5 (2,00 g, 2,91 mmol), a un ácido 4-metoxifenilborónico (0,884 g, 5,82 mmol), a un tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,336 g, 0,291 mmol) y a un carbonato de sodio (1,23 g, 11,6 mmol), se añadió tolueno (20 ml), etanol (10 ml) y agua (10 ml) a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y la solución de reacción se extrajo luego con acetato de etilo, y el extracto se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90: 10 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (1,71 g, 91%).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,38-7,37(3H,m),7,33(1H,s),7,25(1H,s),6,89-6,88(2H,m),5,56-5,54(1H,m),4,71-4,68(1H,m),4,65-4,62(1H,m),4,09-4,04(2H,m),3,96-3,91(4H,m),3,85-3,66(5H,m),3,46-3,45(2H,m),3,16-3,12(1H,m),1,99-1,94(4H,m),1,69-1,64(2H,m),1,00-0,98(2H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:647[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],645[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0336]

Paso 7: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-1,11a-dihidro-5H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,789 g, 1,22 mmol) se disolvió en etanol (10 ml) y THF (10 ml), y se añadió al mismo solución de tetrahidrofurano 2,0 M de borohidruro de litio (6,11 ml, 12,2 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a 0 °C durante 3 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, que se extrajo con cloroformo, y la capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en diclorometano (10 ml), etanol (20 ml) y agua (10 ml), a lo que se añadió gel de sílice (4 g) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. El gel de sílice se eliminó por filtración, y se añadió agua al mismo, y el resultante se extrajo con cloroformo. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 60:40 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,496 g, 81 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,90-7,89(1H,m),7,53(1H,s),7,40-7,40(1H,m),7,35-7,34(2H,m),6,92-6,90(2H,m),6,83-6,81(1H,m),4,43-4,40(1H,m),4,13-4,06(2H,m),3,96(3H,s),3,84(3H,s),3,61-3,57(1H,m),3,47-3,36(3H,m),2,00-

1,92(4H,m),1,67-1,63(2H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:501[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],499[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0337]

Paso 8: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5-ona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 7 (0,496 g, 0,992 mmol) en diclorometano (20 ml), se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (0,421 g, 1,99 mmol) a 0 °C. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió a la misma un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y el resultante se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó luego mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 60:40 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,426 g, 86 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,53-7,53(2H,m),7,32-7,30(2H,m),6,89-6,87(2H,m),6,05(1H,s),4,33-4,27(2H,m),4,00-3,98(2H,m),3,86(3H,s),3,82(3H,s),3,57-3,55(2H,m),3,42-3,38(3H,m),2,76-2,72(1H,m),1,96-1,88(4H,m),1,65-1,62(2H,m). MS(APCI, ESI)m/z:503[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],501[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0338]

Paso 9: Prop-2-en-1-il (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi] -7-metoxi-2-(4-metoxifenil) -5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-10 (5H)-carboxilato

A una solución del compuesto obtenido en el paso 8 (0,426 g, 0,849 mmol) en diclorometano (30 ml), se añadió piridina (0,102 ml, 1,27 mmol) y cloroformiato de alilo (0,374 ml, 3,54 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a 0 °C durante 15 minutos. A la solución de reacción, se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 10 %, que se extrajo con cloroformo, y la capa orgánica obtenida se lavó con un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y luego se secó sobre sulfato de sodio.

El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,465 g, 94%).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,38(1H,s),7,31-7,29(2H,m),7,26-7,25(1H,m),6,89-6,87(2H,m),6,71(1H,s),5,80-5,78(1H,m),5,14-5,11(2H,m),4,65-4,62(1H,m),4,39-4,26(3H,m),4,03-4,01(2H,m),3,92(3H,s),3,82(3H,s),3,66-3,64(1H,m),3,46-3,44(2H,m),3,30-3,27(1H,m),2,72-2,68(1H,m),1,96-1,88(4H,m),1,68-1,60(2H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:587[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],585[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0339]

Paso 10: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-valil-N-{4- [({[(11a'S)-11'- [terc-

butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-{[5-({(11aS) -7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2 -en-1-iloxi) carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il}oxi)pentil]oxi} -5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 1 (0,130 g, 0,161 mmol) y al compuesto obtenido en el paso 9 (0,104 g, 0,177 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml), se añadió carbonato de potasio (0,0266 g , 0,193 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera, y luego se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó luego mediante cromatografía en columna de gel de sílice NH2 [hexano: acetato de etilo = 70:30 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,184 g, 87 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,76(1H,s),7,58-7,56(2H,m),7,39(1H,s),7,32-7,30(2H,m),7,26-7,24(2H,m),7,19-7,17(3H,m),6,90-6,88(2H,m),6,78(1H,s),6,68-6,66(1H,m),6,37(1H,s),5,99-5,93(3H,m),5,34-5,20(6H,m),4,66-4,01(11H,m),3,90(3H,s),3,89(3H,s),3,78-3,54(9H,m),3,31-3,28(2H,m),2,73-2,69(1H,m),2,38-2,35(1H,m),2,19-2,13(1H,m),1,82-1,80(2H,m),1,46-1,29(6H,m),0,98-0,90(6H,m),0,83(9H,s),0,69-0,63(4H,m),0,19-0,16(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1312$(M+H)^+$

[0340]

Paso 11: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-{[5-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil) -5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5, 10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il}oxi)pentil]oxi}-5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il] carbonil} oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 10 (0,1837 g, 0,140 mmol) y a un ácido acético (0,048 mL, 0,840 mmol) en THF (5,00 mL), se añadió una solución de tetrahidrofurano de 1 mol/l de fluoruro de tetrabutilamonio (0,700 mL, 0,700 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se diluyó con acetato de etilo, y la capa orgánica se lavó con un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, y luego se secó sobre sulfato de sodio. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice [cloroformo: metanol = 99,5:0,5 (v/v) a 95:5 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,178 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,86(1H,s),7,60-7,59(2H,m),7,39(1H,s),7,32-7,20(7H,m),6,90-6,88(2H,m),6,78(1H,s),6,68(1H,s),6,38(1H,s),5,90-5,87(3H,m),5,39-5,22(6H,m),4,72-4,02(11H,m),3,90(3H,s),3,88(3H,s),3,83(3H,s),3,70-3,63(6H,m),3,32-3,29(3H,m),2,73-2,69(1H,m),2,43-2,40(1H,m),2,12-2,06(1H,m),1,77-1,74(2H,m),1,39-1,25(6H,m),0,96-0,89(6H,m),0,73-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1198$(M+H)^+$

[0341]

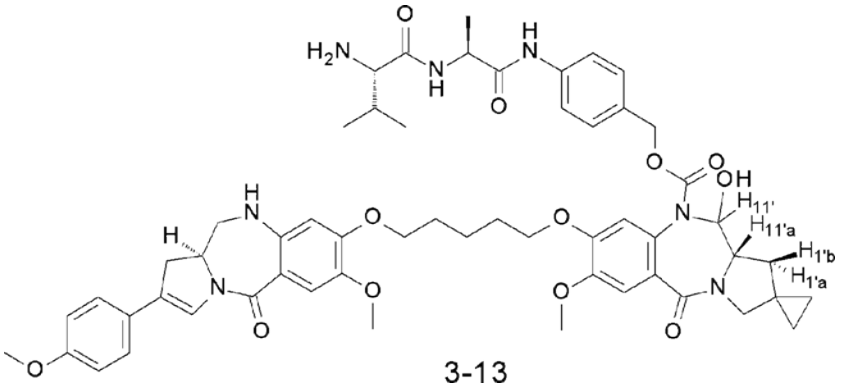
Paso 12: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}pentil)oxi] -5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina] -10'(5'H)-il] carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 11 (0,140 mmol) en diclorometano (2 ml), se añadió pirrolidina (0,0579 ml, 0,700 mmol) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,0162 g, 0,0140 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de la destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice [cloroformo: metanol = 99,5:0,5 (v/v) a 92,5:7,5 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,143 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,12(1H,s),7,94-7,92(1H,m),7,57-7,53(4H,m),7,33-7,31(2H,m),7,20-7,18(3H,m),6,90-6,88(2H,m),6,36(1H,s),6,07(1H,s),5,91-5,88(1H,m),5,47-5,44(1H,m),5,21-5,13(1H,m),4,66-4,58(3H,m),4,32(1H,s),4,03-3,49(17H,m),3,38-3,29(4H,m),3,15-3,14(1H,m),2,77-2,73(1H,m),2,57(2H,s),2,43-2,40(1H,m),2,32-2,27(1H,m),1,81-1,39(8H,m),0,98-0,96(3H,m),0,85-0,83(3H,m),0,75-0,62(4H,m).

$^1$H-RMN($CD_3OD$,50 °C)δ:7,84(1H,s),7,56-7,48(2H,m),7,44-7,32(4H,m),7,26-7,13(3H,m),6,89(2H,d,J=8,5Hz),6,78-6,66(1H,m),6,26(1H,s),5,96(1H,d,J=9,7Hz,H11'),5,27(1H,d,J=12,1Hz),4,96-4,78(1H,m),4,63-4,58(2H,m),4,49(1H,q,J=6,9Hz),4,28-4,19(1H,m),4,07-3,89(4H,m),3,85(3H,s),3,79(3H,s),3,76(3H,s),3,67(1H,d,J=11,5Hz),3,61(1H,d,J=13,3Hz),3,54(1H,dd,J=9,7,8,2Hz,$H_{11'a}$),3,43-3,31(2H,m),3,21(1H,d,J=11,5Hz),3,14(1H,d,J=4,8Hz),2,78(1H,dd,J=16,6,4,5Hz),2,43(1H,dd,J=13,0,8,2Hz,$H_{1'b}$),2,05-1,93(1H,m),1,91-1,75(4H,m),1,73-1,55(2H,m),1,69(1H,d,J=13,3Hz,$H_{1'a}$),1,40(3H,d,J=7,3Hz),0,96(3H,d,J=6,7Hz),0,89(3H,d,J=7,3Hz),0,76-0,58(4H,m).

[Fórmula 127]



3-13

MS(APCI, ESI)m/z:1030$(M+H)^+$

[0342]

Paso 13: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo [b,f] azocin-5 (6H)-il) -4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N- {4-[({[((11a'S) -11'-hidroxi-7'-metoxi-8'- [(5-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil) -5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una mezcla del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 2 (0,0640 g, 0,153 mmol) y a un N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (0,0446 g, 0,180 mmol), se añadió diclorometano (2 ml) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A la solución de reacción, se añadió una solución del compuesto obtenido en el paso 13 (0,143 g, 0,139 mmol) en diclorometano (2 ml), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 99,5: 0,5 (v/v) a 92,5:7,5 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,103 g, 52%).

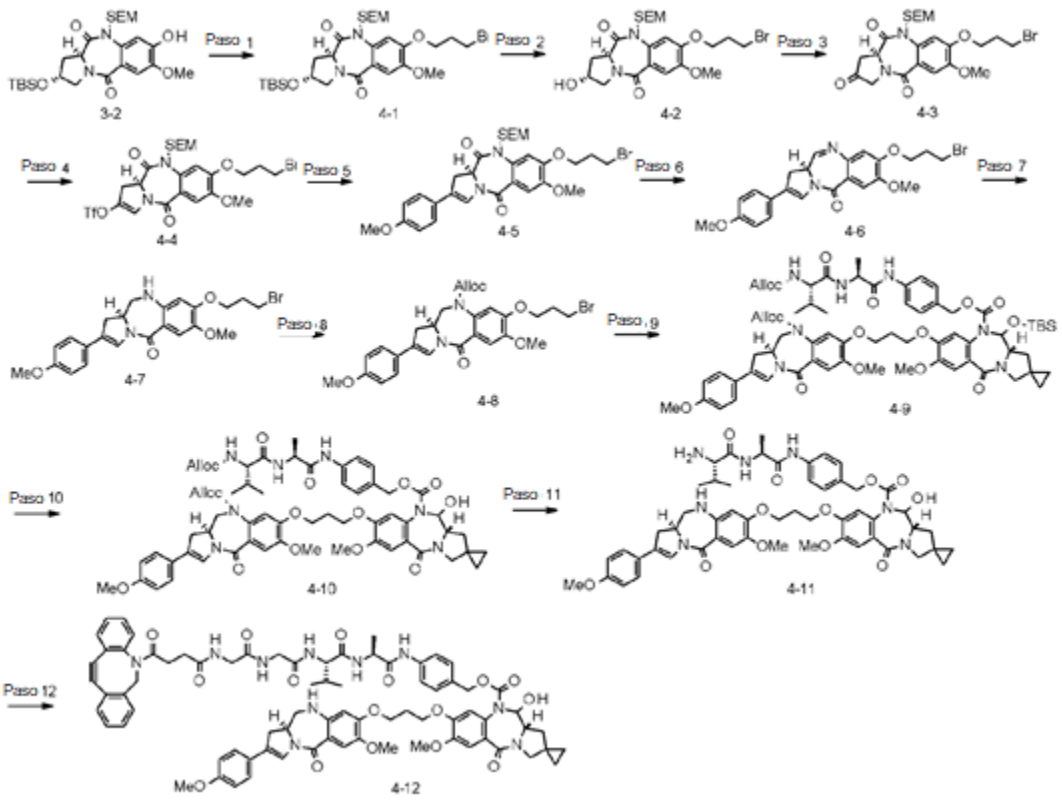
Tabla 1: Posiciones pico de RMN de protón y MS para el enlazador del fármaco 1

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,93(1H,s),8,21-8,16(2H,m),8,07-8,04(1H,m),7,83-7,64(2H,m),7,60-7,55(3H,m),7,51-7,28(10H,m),7,19-7,16(2H,m),7,10-7,04(1H,m),6,92-6,90(2H,m),6,76-6,70(1H,m),6,39(1H,s),5,77-5,75(1H,m),5,21-5,18(1H,m),5,03-4,99(1H,m),4,82-4,79(1H,m),4,37-4,35(1H,m),4,21-4,20(2H,m),4,02-3,24(26H,m),3,16-3,13(1H,m),2,79-2,59(2H,m),2,39-2,28(2H,m), 2,05-1,97(2H,m),1,91-1,77(4H,m),1,57-1,54(3H,m),1,28-1,23(3H,m), 0,85-0,80(6H,m),0,67-0,61(4H,m). MS(APCI, ESI)m/z:1431$(M+H)^+$

[0343]

Ejemplo 4: Enlazador de fármaco 2

[Fórmula 128]




Paso 1: (2R,11aS)-8-3-bromopropoxi)-2-{[terc-butil (dimetil)silil]oxi}-7-metoxi- 10-{[2-(trimetilsilil)etoxi] metil}-2,3-dihidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5,11 (10H,11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 3 (5,06 g, 9,67 mmol) y el ácido 1,3-dibromopropano (4,93 ml, 48,4 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (4,85 g, 78 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,26(1H,s),5,52-5,50(1H,m),4,65-4,63(1H,m),4,61-4,55(1H,m),4,25-4,14(3H,m),3,92(3H,s),3,82-3,62(5H,m),3,57-3,54(1H,m),2,86-2,84(1H,m),2,41-2,39(2H,m),2,06-1,99(1H,m),1,03-0,97(2H,m),0,87(9H,s),0,10(6H,s),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:645[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],643[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0344]

Paso 2: (2R,11aS)-8-(3-Bromopropoxi) -2-hidroxi-7-metoxi-10-{[2-(trimetilsilil) etoxi] metil} -2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin- 5,11 (10H,11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 1 (4,85 g, 7,54 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (4,05 g, cuantitativo).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,26(1H,s),5,53-5,51(1H,m),4,66-4,61(2H,m),4,32-4,30(1H,m),4,21-4,16(2H,m),3,91-3,85(4H,m),3,82-3,74(1H,m),3,71-3,59(4H,m),2,99-2,96(1H,m),2,43-2,37(2H,m),2,15-2,09(2H,m),1,04-0,96(2H,m),0,04(9H,s). MS(APCI, ESI)m/z:531[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],529[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0345]

Paso 3: (11aS)-8-3-bromopropoxi)-7-metoxi-10-{[2- (trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-2,5,11 (3H,10H,11aH)-triona

El compuesto obtenido en el paso 2 (7,54 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 4 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,73 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,34(1H,s),7,29(1H,s),5,56-5,53(1H,m),4,72-4,69(1H,m),4,67-4,61(1H,m),4,23-4,17(3H,m),3,97-3,88(4H,m),3,82-3,75(1H,m),3,74-3,56(4H,m),2,82-2,77(1H,m),243-2,38(2H,m),1,06-0,94(2H,m),0,08-0,00(9H,m).

[0346]

Paso 4: trifluorometanosulfonato de (11aS)-8-(3-bromopropoxi)-7-metoxi-5,11-dioxo-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil} -5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin-2-ilo

El compuesto obtenido en el paso 3 (3,73 g, 7,08 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,27 g, 70 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,33(1H,s),7,29(1H,s),7,15-7,15(1H,m),5,56-5,54(1H,m),4,70-4,65(2H,m),4,21-4,18(2H,m),3,94-3,91(4H,m),3,81-3,79(1H,m),3,70-3,64(3H,m),3,19-3,15(1H,m),2,47-2,38(2H,m),1,02-1,00(2H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:661[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],659[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0347]

Paso 5: (11aS)-8-3-bromopropoxi)-7-metoxi-2- (4-metoxifenil-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil} -1H-pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepin-5,11(10H, 11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 4 (3,27 g, 4,96 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (2,49 g, 81 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,49-7,47(2H,m),7,40(1H,s),7,31-7,24(2H,m),6,93-6,88(2H,m),5,33-5,31(1H,m),5,25-5,18(1H,m),4,81-4,80(1H,m),4,23-4,10(2H,m),3,85(3H,s),3,77(3H,s),3,70-3,59(3H,m),3,52-3,40(2H,m),3,15-3,08(1H,m),2,33-2,27(2H,m),0,86-0,74(2H,m),-0,07(9H,s). MS(APCI, ESI)m/z:619[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],617[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0348]

Paso 6: (11aS)-8-(3-bromopropoxi)-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-1,11a-dihidro-5H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 5 (2,49 g, 4,04 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,59 g, 84 %).

MS(APCI, ESI)m/z:473[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],471[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0349]

Paso 7: (11aS)-8-(3-bromopropoxi)-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 6 (1,59 g, 3,38 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,39 g, 87 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,54(1H,s),7,54-7,51(1H,m),7,32-7,29(2H,m),6,89-6,87(2H,m),6,10(1H,s),4,32-4,28(2H,m),4,14-4,13(2H,m),3,85(3H,s),3,82(3H,s),3,63-3,62(2H,m),3,57-3,55(2H,m),3,40-3,36(1H,m),2,76-2,72(1H,m),2,40-2,37(2H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:475[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],473[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0350]

Paso 8: Prop-2-en-1-il (11aS)-8-(3-bromopropoxi)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-10 (5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 7 (1,40 g, 2,95 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,885 g, 54 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,34(1H,s),7,27-7,25(2H,m),7,22(1H,m),6,86-6,84(2H,m),6,73(1H,s),5,76-5,74(1H,m),5,11-5,09(2H,m),4,62-4,59(2H,m),4,33-4,31(1H,m),4,16-4,13(3H,m),3,88(3H,s),3,79(3H,s),3,60-3,59(3H,m),3,27-3,23(1H,m),2,69-2,65(1H,m),2,37-2,34(2H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:559[$^{81}$Br,$(M+H)^+$],557[$^{79}$Br,$(M+H)^+$].

[0351]

Paso 9: N-{[(Prop-2-en-1-il)oxi]carbonil -L-valil-N-[4- ({[(11'aS)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi} -7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)- 5-oxo-10-{[(prop-2-en-1-il)oxi]carbonil} -5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11', 11'a-dihidro-1'H, 3'H- espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina] -10'(5'H)-carbonil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,0381 g, 0,0683 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0712 g, 81 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1284$(M+H)^+$.

[0352]

Paso 10: N-{[(Prop-2-en-1-il)oxi]carbonil}-L-valil-N-[4- ({[(11'aS)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil) -5-oxo-10-{[(prop-2-en-1-il)oxi]carbonilo}-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il] oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11'a-dihidro-1'H, 3'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-carbonil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,0712 g, 0,0554 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0671 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:1170$(M+H)^+$.

[0353]

Paso 11: L-Valil-N-[4-({[(11'aS)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)) -5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11', 11'a-dihidro-1'H,3'H-espiro [ciclopropano-1,2'- pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5H)-carbonil] oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,0571 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0574 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9-16(1H,s),7-93-7-91(1H,m),7-55-7-52(1H,m),7-50-7-47(3H,m),7-35-7-32(2H,m),7-21(1H,s),7-13-7-11(2H,m),6-90-6-87(2H,m),6-40(1H,s),6-08(1H,s),5-90-5-87(1H,m),5-37-5-34(1H,m),4-73-4-53(3H,m),4-23-4-08(5H,m),3-89(3H,s),3-82(3H,s),3-78-3-72(5H,m),3-57-3-51(3H,m),3-38-3-30(3H,m),2-76-2-71(1H,m),2-36-2-24(4H,m),1-78-1-42(6H,m),1-00-0-98(3H,m),0-87-0-84(3H,m),0-74-0-62(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1002$(M+H)^+$.

[0354]

Paso 12: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo [b,f] azocin-5(6H)-il) -4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-[4-({[(11'aS) -11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil) -5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11', 11'a-dihidro-1'H,3'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-carbonil]oxi} metil)fenil]-L-alaninamida

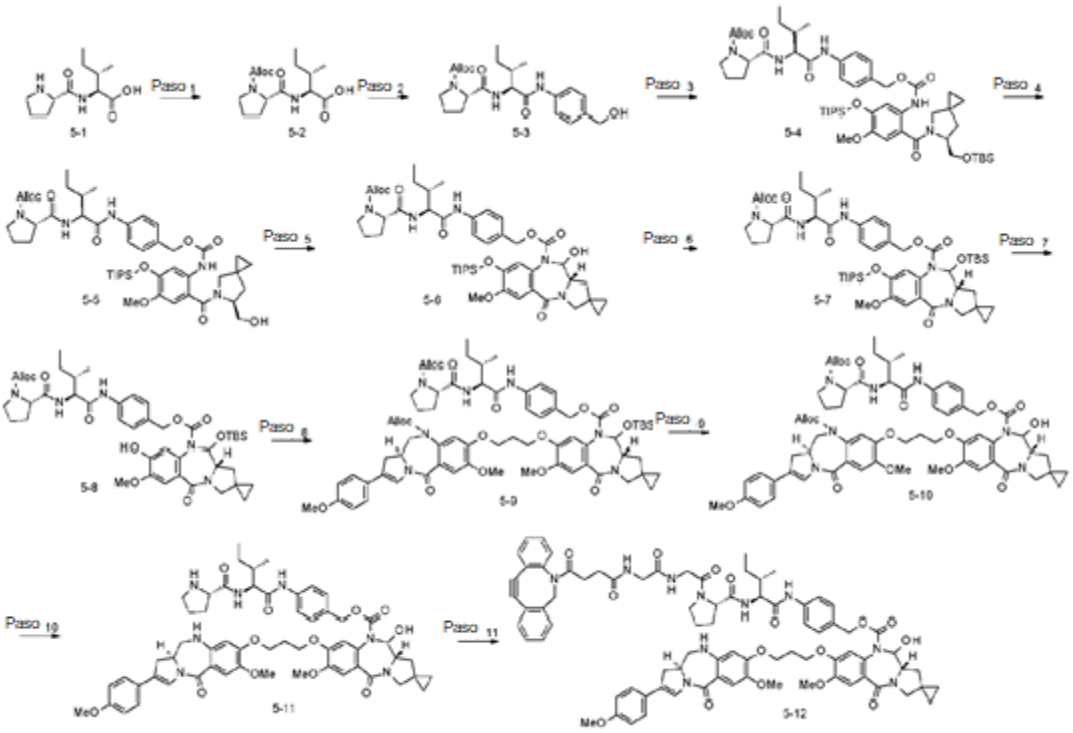
El compuesto obtenido en el paso 11 (0,189 g, 0,189 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,169 g, 64 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1402$(M+H)^+$.

[0355]

Ejemplo 5: Enlazador de fármaco 3

[Fórmula 129]



Paso 1: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-L-isoleucina

A una solución acuosa de hidróxido de sodio de 1 mol/l (8,80 ml, 8,80 mmol) con una solución de L-prolil-L-isoleucina (1,00 g, 4,40 mmol) en 1,4-dioxano (30 ml), se añadió lentamente gota a gota cloroformiato de alilo (0,690 ml, 6,53 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, y luego se añadió una solución acuosa de hidrogenosulfato de potasio a la mezcla de reacción para ajustar el pH a aproximadamente 4, y la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se filtró y luego se concentró a presión reducida, y se añadió hexano al residuo. El sólido generado se recolectó por filtración y se secó para proporcionar el compuesto deseado (1,20 g, 88 %).

MS(APCI, ESI)m/z:311(M-H)-

[0356]

Paso 2: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-[4- (hidroximetil)fenil]-L-isoleucinamida

A la solución de THF (100 ml) del compuesto obtenido en el paso 1 (13,7 g, 43,4 mmol) y al alcohol 4-aminobencílico (6,00 g, 48,7 mmol), se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (12,0 g , 48,7 mmol) a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas, a lo que se añadió éter dietílico (200 ml), y luego se recolectó por filtración un sólido generado, y el compuesto (13,2 g, 65 %) obtenido se usó directamente para la reacción posterior.

[0357]

Paso 3: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-propil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil) -5-azaspiro [2.4] hept-5-il] carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil) fenil]-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 2 (6,87 g, 16,5 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (7,46 g, 56 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8-99-8-97(1H,m),8-45-8-42(1H,m),7-81-7-49(3H,m),7-36-7-33(2H,m),6-81-6-77(2H,m),5-96-5-91(1H,m),5-32-5-23(2H,m),5-13-5-10(2H,m),4-73-4-30(6H,m),4-00-3-98(1H,m),3-78-3-52(7H,m),3-06-3-02(1H,m),2-37-2-12(5H,m),2-06-1-92(1H,m),1-77-1-48(2H,m),1-32-1-27(3H,m),1-11-1-09(18H,m),1-03-0-91(15H,m),0-66-0-44(4H,m),0-09-0-04(6H,m).

[0358]

Paso 4: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro [2.4]hept-5-il] carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi} fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 3 (7,46 g, 7,41 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (6,07 g, 92 %).

MS(APCI, ESI)m/z:892$(M+H)^+$

[0359]

Paso 5: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (6,07 g, 6,80 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (4,18 g, 69 %).

MS(APCI, ESI)m/z:890$(M+H)^+$

[0360]

Paso 6: 1[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-propil-N-{4- [({[(11a'S)-11'- [terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri (propan-2-il)silil]oxi}-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2, 1-c] [1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (4,18 g, 4,70 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (4,26 g, 90 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1004$(M+H)^+$

[0361]

Paso 7: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espirociclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (4,26 g, 4,70 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,48 g, 69 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,44-8,41(1H,m),7,53-7,37(1H,m),7,24-7,23(1H,m),7,14-7-11(2H,m),6-82(1H,s),6-67-6-65(1H,m),6-11-6-07(1H,m),5-99-5-95(2H,m),5-33-5-02(4H,m),4-84-4-41(5H,m),3-94(3H,s),3-73-3-70(1H,m),3-59-3-52(4H,m),3-29-3-26(1H,m),2-39-2-24(5H,m),1-99-1-97(2H,m),1-56-1-53(1H,m),1-10-0-64(19H,m),0-20-0-16(3H,m),0-09-0-07(3H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:848$(M+H)^+$

[0362]

Paso 8: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]- 5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-il}oxi)propoxi]-5'- oxo-11'-[(trimetilsilil)oxi]-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,200 g, 0,236 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,308 g, 99 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1324$(M+H)^+$

[0363]

Paso 9: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,308 g, 0,233 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,261 g, 93 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1210$(M+H)^+$

[0364]

Paso 10: L-Prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi- 2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,261 g, 0,216 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,183 g, 81 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,06(1H,s),8,33-8,31(1H,m),7,53-7,47(4H,m),7,33-7,31(2H,m),7,21(1H,s),7,11-7,09(2H,m),6,89-6,87(2H,m),6,40(1H,s),6,08(1H,s),5,91-5,88(1H,m),5,35-5,32(1H,m),4,69-4,66(2H,m),4,45-4,28(3H,m),4,15-4,05(3H,m),3,87(3H,s),3,82(3H,s),3,78(3H,s),3,74-3,72(3H,m),3,64-3,47(3H,m),3,37-3,30(2H,m),3,04-3,00(1H,m),2,94-2,88(1H,m),2,75-2,72(1H,m),2,42-2,39(1H,m),2,13-2,05(4H,m),1,92-1,55(6H,m),1,20-1,14(1H,m),0,98-0,96(3H,m),0,91-0,89(3H,m),0,70-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1042$(M+H)^+$

[0365]

Paso 11: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

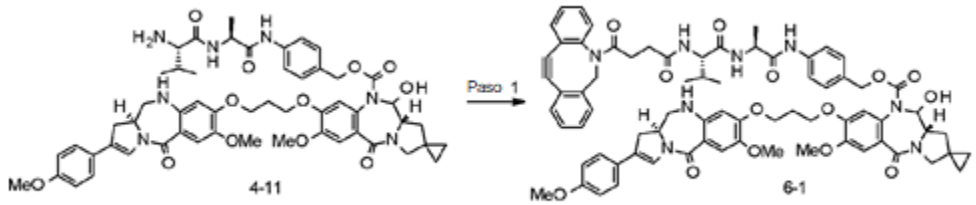
El compuesto obtenido en el paso 10 (0,0474 g, 0,455 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0495 g, 75 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1443$(M+H)^+$

[0366]

Ejemplo 6: Enlazador de fármaco 4

[Fórmula 130]

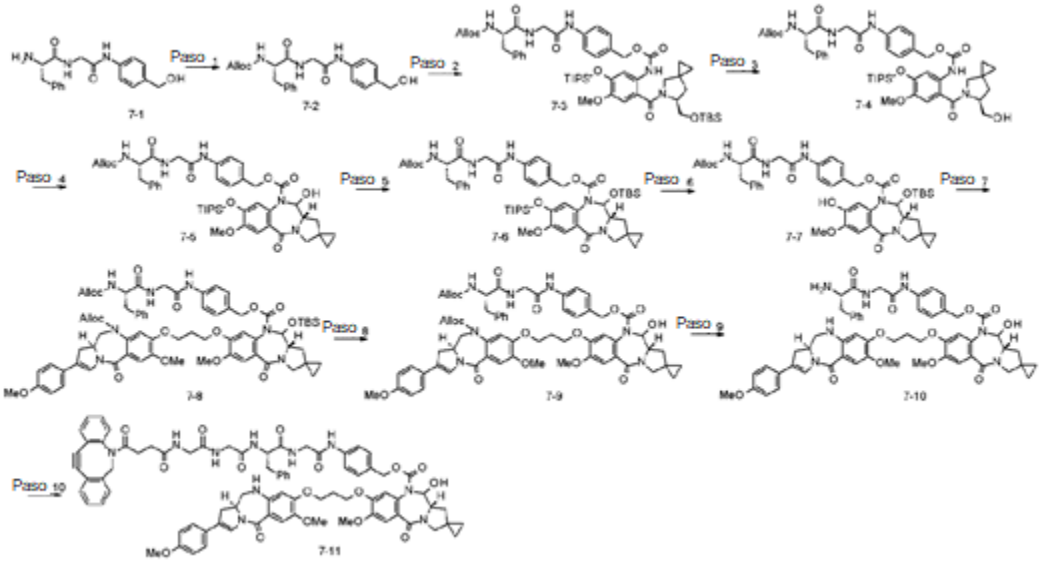



Paso 1: A una solución del compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 4 (0,0564 g, 0,0563 mmol) y a una trietilamina (0,00936 ml, 0,0675 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml), se añadió 1-{[4-(11,12-didehidrodibenzo [b,f]azocin-5 (6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (0,0249 g, 0,0619 mmol) a temperatura ambiente. El resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y luego
se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 99,5:0,5 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,0490 g, 68 %).
MS(APCI, ESI)m/z:1289$(M+H)^+$

[0367]

Ejemplo 7: Enlazador de fármaco 5

[Fórmula 131]




Paso 1: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-[4- (hidroximetil)fenil]glicinamida

A una solución del material de partida 7-1 (1,24 g, 3,80 mmol, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015, 3, 3237-3247) y a un carbonato de potasio (0,945 g, 6,84 mmol) en THF (18 ml) y agua (12 ml), se añadió cloroformiato de alilo (0,482 ml, 4,560 mmol) a 0 °C y se añadió a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la extracción con acetato de etilo, el extracto se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio.

El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió luego

en una pequeña cantidad de acetato de etilo, al que se añadió éter dietílico. Se recolectó por filtración un sólido generado (1,30 g, 83 %) y se usó directamente para la reacción posterior.

[0368]

Paso 2: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 1 (1,30 g, 3,16 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,32 g, 54 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,01(1H,s),8,38(1H,s),7,80(1H,s),7,60-7,58(2H,m),7,32-7,29(5H,m),7,19-7,18(2H,m),6,76(1H,s),6,55(1H,s),5,89-5,83(1H,m),5,24-5,13(5H,m),4,56-4,55(3H,m),4,34-4,33(1H,m),4,10-4,06(1H,m),3,98-3,94(2H,m),3,75-3,72(5H,m),3,16-3,08(3H,m),2,28-2,25(1H,m),1,70-1,68(1H,m),1,30-1,27(3H,m),1,11-1,09(18H,m),0,90(9H,s),0,65-0,48(4H,m),0,05-0,02(6H,m). MS(APCI, ESI)m/z:1000$(M+H)^+$

[0369]

Paso 3: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6- (hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 2 (1,32 g, 1,32 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,23 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,48-8,38(2H,m),7,71(1H,s),7,61-7,59(2H,m),7,36-7,27(5H,m),7,20-7,18(2H,m),6,76(1H,s),6,55-6,52(1H,m),5,89-5,83(1H,m),5,28-5,13(5H,m),4,56-4,55(3H,m),4,34-4,33(1H,m),4,22-4,20(1H,m),4,10-4,06(1H,m),3,98-3,94(1H,m),3,78-3,75(5H,m),3,64-3,62(1H,m),3,17-3,07(3H,m),1,84-1,83(2H,m),1,30-1,26(3H,m),1,11-1,09(18H,m),0,61-0,49(4H,m). MS(APCI, ESI)m/z:886$(M+H)^+$

[0370]

Paso 4: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,32 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,660 g, 57 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,34(1H,s),7,53-7,51(2H,m),7,26-7,18(8H,m),6,66-6,57(2H,m),5,88-5,80(2H,m),5,27-5,21(3H,m),5,11-5,07(1H,m),4,99-4,96(1H,m),4,55-4,54(2H,m),4,36-4,34(1H,m),4,13-3,92(2H,m),3,83(3H,s),3,73-3,70(1H,m),3,57-3,55(1H,m),3,46-3,44(1H,m),3,32-3,29(1H,m),3,18-3,15(1H,m),3,09-3,05(1H,m),2,42-2,38(1H,m),1,75-1,72(1H,m),1,25-1,02(21H,m),0,73-0,60(4H,m).
MS(APCI, ESI)m/z:884$(M+H)^+$
[0371]
Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,834 g, 0,943 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,555 g, 59 %).
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,26-8,23(1H,m),7,51-7,50(2H,m),7,29-7,28(3H,m),7,18-7,13(5H,m),6,64-6,62(1H,m),6,52-6,49(1H,m),6,02-6,00(1H,m),5,88-5,83(1H,m),5,25-5,17(4H,m),4,84-4,81(1H,m),4,55-4,55(2H,m),4,34-4,33(1H,m),4,06-3,97(2H,m),3,84(3H,s),3,71-3,68(1H,m),3,50-3,48(1H,m),3,28-3,05(3H,m),2,36-2,33(1H,m),1,56-1,53(1H,m),1,28-1,01(21H,m),0,81-0,61(13H,m),0,19(3H,s),0,09(3H,s). MS(APCI, ESI)m/z:998$(M+H)^+$
[0372]
Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,555 g, 0,556 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,451 g, 96 %).
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,42-8,40(1H,m),7,50-7,46(2H,m),7,28-7,26(3H,m),7,20-7,18(3H,m),7,10-7,08(2H,m),6,67-6,65(2H,m),6,16-6,13(1H,m),6,02-5,99(1H,m),5,88-5,82(1H,m),5,28-5,18(4H,m),4,87-4,84(1H,m),4,54-4,53(2H,m),4,38-4,36(1H,m),4,10-4,07(1H,m),3,93-3,90(4H,m),3,72-3,69(1H,m),3,54-3,52(1H,m),3,25-3,17(2H,m),3,08-3,04(1H,m),2,36-2,33(1H,m),1,57-1,54(1H,m),0,81-0,61(13H,m),0,19(3H,s),0,10(3H,s).
MS(APCI, ESI)m/z:842$(M+H)^+$
[0373]

Paso 7: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)- 5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,115 g, 0,137 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,160 g, 89 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1318$(M+H)^+$

[0374]

Paso 8: N-[(Prop-2-en-1-il)carbonil]-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,160 g, 0,121 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,136 g, 93 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1204$(M+H)^+$

[0375]

Paso 9: L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7- metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,136 g, 0,113 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0372 g, 32 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,84-8,81(1H,m),8,07-8,05(1H,m),7,53-7,39(4H,m),7,34-7,19(8H,m),7,12-7,10(2H,m),6,90-6,87(2H,m),6,44-6,42(1H,m),6,10-6,08(1H,m),5,90-5,88(1H,m),5,38-5,35(1H,m),4,76-4,72(1H,m),4,57-4,44(1H,m),4,32-4,29(1H,m),4,17-4,01(5H,m),3,89-3,52(17H,m),3,41-3,25(3H,m),2,72-2,69(2H,m),2,43-2,40(1H,m),2,19-2,16(2H,m),1,78-1,74(1H,m),1,59-1,56(1H,m),0,72-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1036$(M+H)^+$

[0376]

Paso 10: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'- (3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-

il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}glicinamida

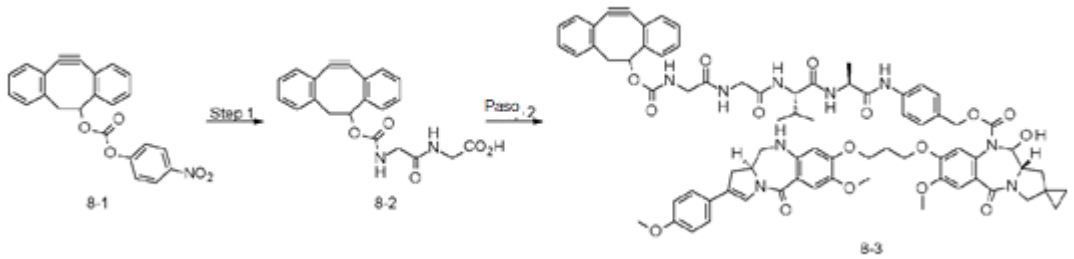
El compuesto obtenido en el paso 9 (0,0372 g, 0,0359 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0170 g, 33 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1437$(M+H)^+$

[0377]

Ejemplo 8: Enlazador de fármaco 6

[Fórmula 132]




Paso 1: N-[(11,12-Didehidro-5,6-dihidrodibenzo[a,e][8]annulen-5-iloxi)carbonil]glicilglicina

A una solución de 11,12-didehidro-5,6-dihidrodibenzo [a,e] [8] annulen-5-il-4-nitrofenilcarbamato (0,437 g, 1,14 mmol) y a una N,N-diisopropiletilamina (0,198 mL, 1,14 mmol) en N,N-dimetilformamida (6 ml), se añadió glicilglicina (0,150 g, 1,14 mmol) y agua (3 ml) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,324 g, 75 %). MS(APCI, ESI)m/z:378$(M+H)^+$

[0378]

Paso 2: N-[(11,12-Didehidro-5,6-dihidrodibenzo[a,e][8]annulen-5-iloxi)carbonil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

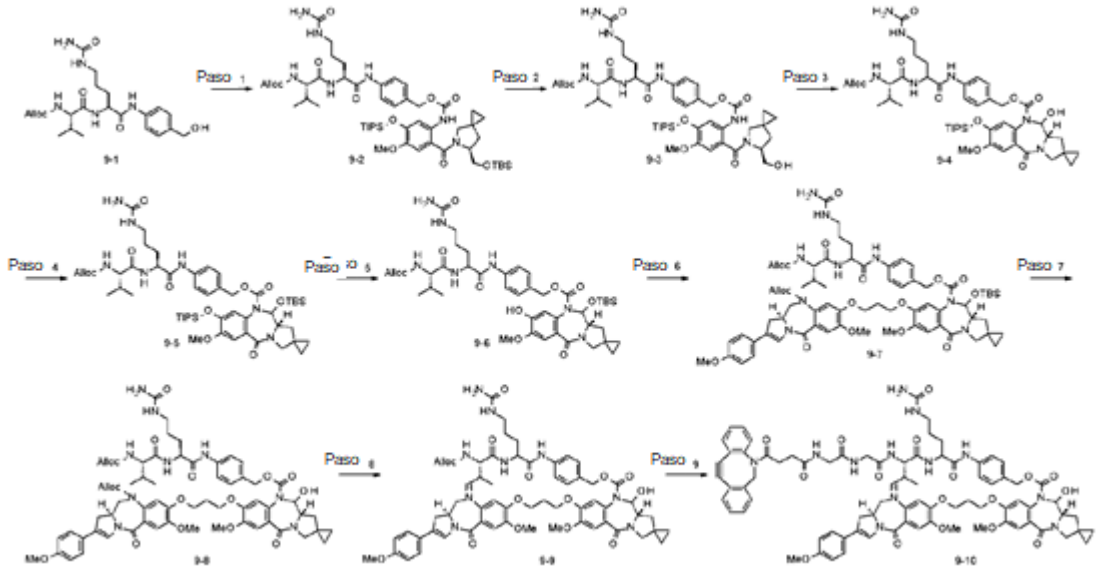
El compuesto obtenido en el paso 1 (0,0306 g, 0,0305 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0361 g, 87%).

MS(APCI, ESI)m/z:1362$(M+H)^+$

[0379]

Ejemplo 9: Enlazador de fármaco 7

[Fórmula 133]



Paso 1: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil)]oxi}metil) -5-azaspiro [2.4] hept-5-il] carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-N5-carbamoil-L-ornitinamida

El material de partida 9-1 se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,37 g, 45 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,06(1H,s),9,16(1H,s),8,10-8,06(1H,m),7,62-7,60(2H,m),7,33-7,31(2H,m),7,27-7,24(2H,m),6,84-6,81(1H,m),5,94-5,89(2H,m),5,41(2H,s),5,32-5,28(1H,m),5,18-5,16(1H,m),5,03(2H,s),4,48-4,42(3H,m),4,30(1H,s),3,93-3,73(6H,m),3,47-3,14(3H,m),3,00-2,95(2H,m),2,00-1,89(2H,m),1,65-1,60(2H,m),1,42-1,39(2H,m),1,26-1,19(3H,m),1,04-1,01(18H,m),0,88-0,75(15H,m),0,51-0,49(4H,m),0,05-0,17(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1052$(M+H)^+$

[0380]

Paso 2: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N5-carbamoil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornitinamida

El compuesto obtenido en el paso 1 (1,37 g, 1,31 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,00 g, 82 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,07(1H,s),9,13(1H,s),8,11-8,09(1H,m),7,62-7,60(2H,m),7,34-7,31(2H,m),7,26-7,23(2H,m),6,92-6,90(1H,m),5,97-5,86(2H,m),5,41(2H,s),5,32-

5,28(1H,m),5,19-5,16(1H,m),5,04(2H,s),4,80(1H,s),4,48-4,41(3H,m),4,27(1H,s),3,93-3,87(1H,m),3,74(3H,s),3,61-3,58(2H,m),3,39-3,30(2H,m),3,03-2,97(3H,m),2,00-1,84(2H,m),1,65-1,60(2H,m),1,44-1,37(2H,m),1,26-1,19(3H,m),1,05-1,04(18H,m),0,87-0,83(6H,m),0,53-0,42(4H,m). MS(APCI, ESI)m/z:938$(M+H)^+$

[0381]

Paso 3: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N5-carbamoil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxi-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida

A una mezcla del compuesto obtenido en el paso 2 (1,00 g, 1,07 mmol), a un diclorometano (80 ml) y a una dimetilformamida (10 ml), se añadió periodinano Dess-Martin (0,455 g, 1,07 mmol) a 0 °C. Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, se añadió nuevamente a los mismos periodinano Dess-Martin (0,455 g, 1,07 mmol), y el resultante se agitó a 0 °C durante 1 hora. A la solución de reacción, se añadió un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado, y el resultante se extrajo con cloroformo, y el extracto se lavó luego con salmuera. El resultante se destiló a presión reducida, a lo que luego se añadió acetato de etilo, y se recolectó un sólido por filtración. El filtrado se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 50:50 a hexano: acetato de etilo
= 0:100 (v/v)] y se combinó con el sólido para proporcionar el compuesto deseado (0,671 g, 67 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,05(1H,s),8,11-8,09(1H,m),7,56-7,54(2H,m),7,25-7,23(1H,m),7,13-7,09(3H,m),6,62(1H,s),6,53(1H,s),5,94-5,88(2H,m),5,78-5,76(1H,m),5,40(2H,s),5,32-5,28(1H,m),5,17-5,14(2H,m),4,81-4,78(1H,m),4,48-4,41(3H,m),3,92-3,90(1H,m),3,79(3H,s),3,54-3,51(1H,m),3,16-3,14(1H,m),3,02-2,89(2H,m),2,37-2,34(2H,m),1,97-1,92(1H,m),1,63-1,57(3H,m),1,43-1,37(2H,m),1,08-1,01(21H,m),0,87-0,83(6H,m),0,67-0,61(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:938$(M+H)^+$

[0382]

Paso 4: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-valil-N-{4- [({[(11a'S)-11'- [terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N5-carbamoil-L-ornitinamida

Con el uso de un disolvente mixto de diclorometano (80 ml) y dimetilformamida (5 ml), el compuesto obtenido en el paso 3 (0,671 g, 0,712 mmol) se hizo reaccionar de la

misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,335 g, 44 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,04(1H,s),8,12-8,10(1H,m),7,56-7,54(2H,m),7,26-7,24(1H,m),7,14-7,11(3H,m),6,51(1H,s),5,94-5,91(3H,m),5,40-5,16(5H,m),4,79-4,76(1H,m),4,47-4,44(3H,m),3,92-3,90(1H,m),3,80(3H,s),3,55-3,52(1H,m),3,17-3,14(1H,m),3,00-2,96(3H,m),2,56-2,30(1H,m),2,06-1,17(6H,m),1,10-0,99(21H,m),0,78-0,61(19H,m),0,17(3H,s),0,07(3H,s). MS(APCI, ESI)m/z:1050$(M+H)^+$

[0383]

Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N5-carbamoil-L-ornitinamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,355 g, 0,712 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,264 g, 93 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,07-10,03(1H,m),9,89-9,86(1H,m),8,12-8,10(1H,m),7,63-7,54(2H,m),7,35-7,26(1H,m),7,14-7,12(2H,m),7,06(1H,s),6,62-6,59(1H,m),5,97-5,87(3H,m),5,43-5,40(2H,m),5,32-5,28(1H,m),5,17-5,14(2H,m),4,86-4,82(1H,m),4,46-4,42(3H,m),3,91-3,89(1H,m),3,81(3H,s),3,54-3,51(1H,m),3,42-3,40(1H,m),3,09-2,96(3H,m),2,40-2,34(1H,m),1,98-1,97(1H,m),1,68-1,59(2H,m),1,42-1,38(3H,m),0,77-0,64(19H,m),0,16(3H,s),0,08(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:894$(M+H)^+$

[0384]

Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)- 5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N5-carbamoil-L-ornitinamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,113 g, 0,126 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,149 g, 86 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1370$(M+H)^+$

[0385]

Paso 7: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N5-carbamoil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-

hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop- 2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,149 g, 0,109 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,119 g, 87 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1256$(M+H)^+$

[0386]

Paso 8: L-Valil-N5-carbamoil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,050 g, 0,0398 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0347 g, 80 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,43(1H,s),7,96-7,94(1H,m),7,51-7,46(4H,m),7,33-7,31(2H,m),7,22(1H,s),7,13-7,11(2H,m),6,90-6,87(2H,m),6,46(1H,s),6,11(1H,s),5,92-5,89(1H,m),5,42-5,39(2H,m),4,78-4,67(4H,m),4,31-4,29(1H,m),4,11-4,04(3H,m),3,92-3,70(13H,m),3,60-3,23(8H,m),3,07-3,05(1H,m),2,75-2,70(1H,m),2,43-2,39(1H,m),2,19-2,16(3H,m),1,73-1,48(6H,m),0,98-0,96(3H,m),0,83-0,81(3H,m),0,71-0,65(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1088$(M+H)^+$

[0387]

Paso 9: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N5-carbamoil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'- metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a- tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-ornitinamida

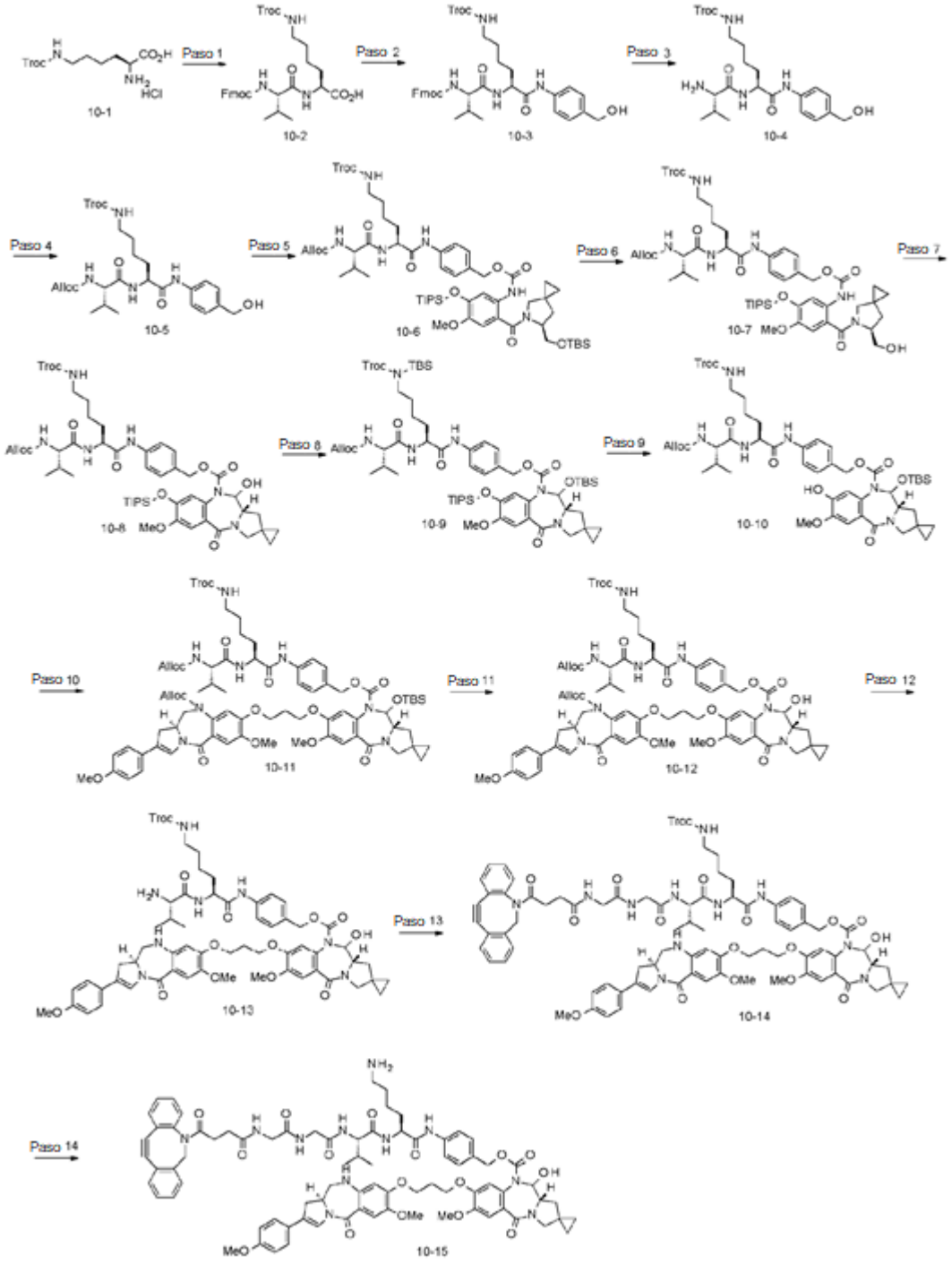
El compuesto obtenido en el paso 8 (0,0347 g, 0,0319 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,00650 g, 14 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1489$(M+H)^+$

[0388]

Ejemplo 10: Enlazador de fármaco 8

[Fórmula 134]




Paso 1: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N6-[(2,2,2- tricloroetoxi)carbonil]-L-lisina

A una solución de material de partida 10-1 (2,78 g, 7,75 mmol, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2012, 76, 205) en 1,2-dimetoxietano (30 ml), a agua (30 ml) y a un THF (15 ml), se añadió hidrogenocarbonato de sodio (1,30 g, 15,5 mmol) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi) carbonil]-L-valinato (3.39 g, 7,76 mmol) a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante cinco días, y luego se extrajo con un líquido mixto de cloroformo y metanol (10:1, v/v). La

capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se lavó con éter dietílico y se eliminó un sólido por filtración. El filtrado se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 30:70 (v/v) a 0: 100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (2,13 g, 43 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,78-7,76(2H,m),7,60-7,58(2H,m),7,41-7,39(2H,m),7,32-7,30(2H,m),6,85-6,83(1H,m),5,58-5,56(1H,m),5,32-5,30(1H,m),4,72-4,57(3H,m),4,46-4,34(2H,m),4,23-4,21(1H,m),4,05-4,03(1H,m),3,22-3,15(2H,m),2,06-1,88(3H,m),1,52-1,51(2H,m),1,40-1,38(2H,m),0,97-0,96(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:642$(M+H)^+$

[0389]

Paso 2: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 1 (2,11 g, 3,29 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 5, y el compuesto resultante (2,24 g, 91 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0390]

Paso 3: L-Valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 2 (2,24 g, 3,00 mmol) en N,N-dimetilformamida (20 ml), se añadió piperidina (0,5934 ml, 5,994 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante (1,576 g, cuantitativo) se usó directamente para la reacción posterior.

[0391]

Paso 4: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-N6- [(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,58 g, 3,00 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 7, y el compuesto resultante (1,50 g, 82 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0392]

Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil)]oxi}metil) -5-azaspiro [2.4] hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,57 g, 2,57 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,691 g, 71 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,04-9,02(1H,m),8,48-8,45(1H,m),7,81(1H,s),7,55-7,53(2H,m),7,35-7,33(2H,m),6,76(1H,s),6,68-6,66(1H,m),5,94-5,86(1H,m),5,32-5,23(4H,m),5,14-5,10(2H,m),4,79-4,76(1H,m),4,69-4,67(1H,m),4,57-4,54(4H,m),4,03-4,02(2H,m),3,75-3,72(5H,m),3,29-3,22(2H,m),3,04-3,02(1H,m),2,27-2,01(4H,m),1,83-1,58(3H,m),1,46-1,44(2H,m),1,31-1,27(3H,m),1,11-1,09(18H,m),1,00-0,90(15H,m),0,65-0,48(4H,m),0,06-0,03(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1219$(M+Na)^+$

[0393]

Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)- 5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (1,69 g, 1,41 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,43 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,57-8,52(2H,m),7,70(1H,s),7,56-7,54(2H,m),7,35-7,33(2H,m),6,76-6,75(2H,m),5,91-5,90(1H,m),5,40-5,26(4H,m),5,12(2H,s),4,78-4,75(1H,m),4,69-4,66(1H,m),4,58-4,55(4H,m),4,37-4,34(1H,m),4,04-4,02(1H,m),3,80-3,77(5H,m),3,65-3,62(1H,m),3,28-3,11(3H,m),2,13-2,04(2H,m),1,81-1,78(3H,m),1,60-1,58(2H,m),1,45-1,43(2H,m),1,33-1,25(3H,m),1,11-1,09(18H,m),0,98-0,94(6H,m),0,58-0,51(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1083$(M+H)^+$

[0394]

Paso 7: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (1,43 g, 1,32 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (0,714 g, 50 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,49-8,46(1H,m),7,52-7,45(2H,m),7,19-7,18(3H,m),6,72-6,68(2H,m),5,90-5,87(2H,m),5,33-5,23(4H,m),5,10-5,07(1H,m),4,98-4,95(1H,m),4,78-4,76(1H,m),4,69-4,66(1H,m),4,58-4,53(3H,m),4,01(1H,s),3,83-3,81(4H,m),3,73-3,70(1H,m),3,57-3,55(2H,m),3,29-3,25(3H,m),2,42-2,39(1H,m),2,15-2,13(1H,m),2,03-2,01(2H,m),1,74-1,71(2H,m),1,44-1,42(2H,m),1,23-1,17(3H,m),1,03-0,93(24H,m),0,67-0,64(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1081$(M+H)^+$

[0395]

Paso 8: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N6-[terc-butil(dimetil)silil]-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,714 g, 0,660 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,476 g, 60 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,63-8,51(1H,m),7,49-7,48(2H,m),7,18-7,14(3H,m),6,61-6,53(2H,m),5,99-5,94(2H,m),5,33-5,17(4H,m),4,81-4,78(3H,m),4,59-4,57(3H,m),4,03-4,01(1H,m),3,88-3,85(4H,m),3,70-3,67(2H,m),3,50-3,47(1H,m),3,24-3,17(3H,m),2,37-2,34(1H,m),2,13-2,07(2H,m),1,59-1,54(3H,m),1,38(2H,s),1,16-0,92(35H,m),0,81-0,76(9H,m),0,67-0,64(4H,m),0,34-0,31(6H,m),0,19(3H,s),0,09(3H,s).

[0396]

Paso 9: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N6-[terc-butil(dimetil)silil]-N-{4-[({[(11'S,11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo- 11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]- 10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,476 g, 0,398 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,283 g, 68 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,48(1H,s),7,51-7,47(2H,m),7,25-7,24(2H,m),7,12-7,10(2H,m),6,70-6,67(2H,m),6,09-6,07(1H,m),5,98-5,92(2H,m),5,33-5,20(5H,m),4,82-4,71(3H,m),4,59-4,56(3H,m),4,03-4,00(1H,m),3,91(3H,s),3,72-3,69(1H,m),3,54-3,52(1H,m),3,28-3,25(3H,m),2,37-2,34(1H,m),2,18-2,16(1H,m),2,05-1,99(1H,m),1,78-1,75(1H,m),1,56-1,53(2H,m),1,43-1,41(2H,m),0,98-0,94(6H,m),0,82-0,75(9H,m),0,67-0,64(4H,m),0,19(3H,s),0,10(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:1039$(M+H)^+$

[0397]

Paso 10: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)- 5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6- [(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,119 g, 0,114 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,134 g, 77 %).

[0398]

Paso 11: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2- tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,134 g, 0,0881 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,120 g, 97 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1423$(M+Na)^+$

[0399]

Paso 12: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,120 g, 0,0855 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0813 g, 77 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,10(1H,s),7,94-7,92(1H,m),7,58(1H,s),7,47-7,45(3H,m),7,35-7,33(2H,m),7,21(2H,s),7,13-7,11(2H,m),6,90-6,88(2H,m),6,43(1H,s),6,11(1H,s),5,90-5,88(1H,m),5,51(1H,s),5,39-5,36(1H,m),4,73-4,70(3H,m),4,52-4,51(2H,m),4,32(1H,s),4,13-4,08(3H,m),3,89(3H,s),3,80-3,76(9H,m),3,60-3,50(4H,m),3,34-3,24(5H,m),2,76-2,72(1H,m),2,44-2,12(4H,m),1,94-1,27(7H,m),1,00-0,98(3H,m),0,84-0,82(3H,m),0,70-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1233$(M+H)^+$

[0400]

Paso 13: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisinamida

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,0813 g, 0,0659 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0721 g, 67 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1656$(M+Na)^+$

[0401]

Paso 14: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-lisinamida

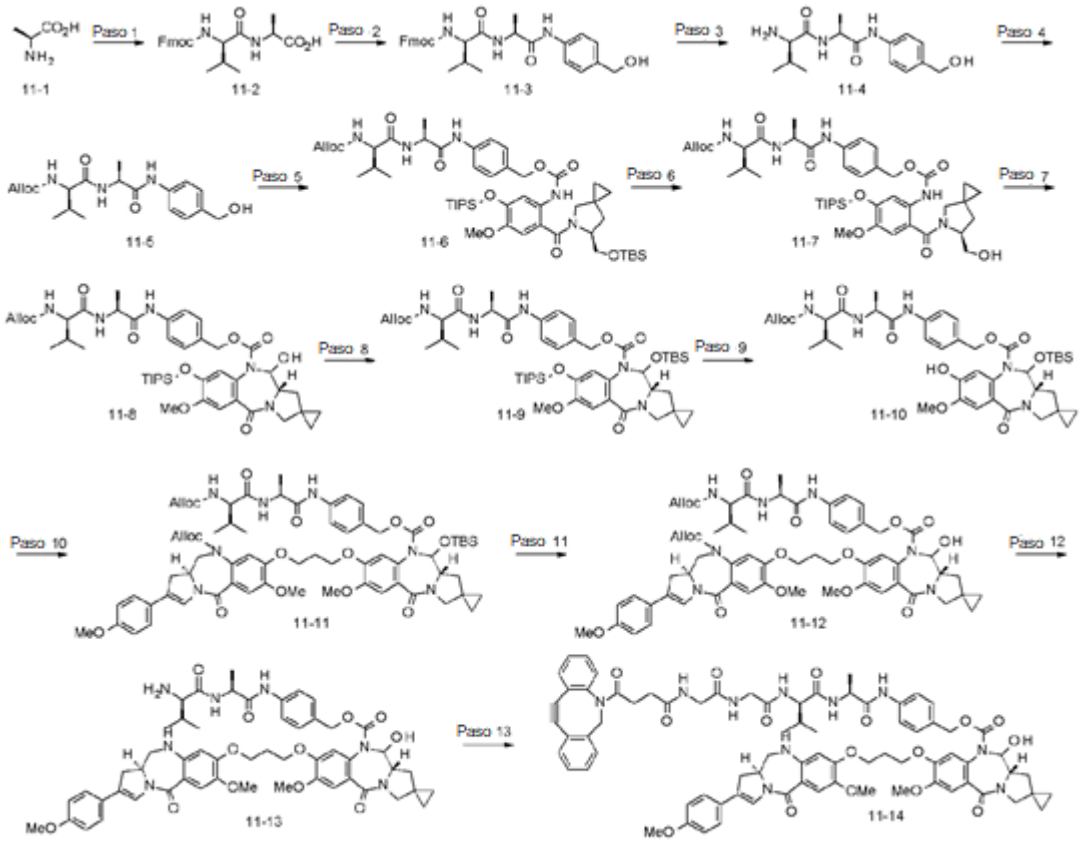
El compuesto obtenido en el paso 13 (0,0721 g, 0,0441 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (0,0348 g, 54 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1460$(M+H)^+$

[0402]

Ejemplo 11: Enlazador de fármaco 9

[Fórmula 135]




Paso 1: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-D-valil-L-alanina

Se hizo reaccionar L-alanina (0,0721 g, 0,0441 mmol) de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 10, excepto que se utilizó 2,5-dioxopirrolidin-1-il N - [((9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-D-valinato (0,528 g, 5,92 mmol) en lugar de 2,5-dioxopirrolidin-1-il N-[(9H-fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-valinato. El compuesto resultante (0,0348 g, 54 %) se usó directamente para la reacción posterior.

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,55(1H,s),8,23-8,21(1H,m),7,91-7,89(2H,m),7,76-7,75(2H,m),7,42-7,40(3H,m),7,33-7,31(2H,m),4,31-4,20(4H,m),3,93-3,91(1H,m),1,97-1,93(1H,m),1,27-1,25(3H,m),0,86-0,84(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:411$(M+H)^+$

[0403]

Paso 2: N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-D-valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 1 (2,05 g, 4,99 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 5, y el compuesto resultante (2,19 g, 85 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0404]

Paso 3: D-Valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 2 (2,19 g, 4,25 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 10, y el compuesto resultante (0,966 g, 76 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0405]

Paso 4: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto (0,966 g, 3,29 mmol) obtenido en el paso 3 se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 7, y el compuesto resultante (1,11 g, 89 %) se usó directamente para la reacción posterior.

[0406]

Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,11 g, 2,93 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,75 g, 80 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,02(1H,s),8,55(1H,s),7,81(1H,s),7,57-7,54(2H,m),7,34-7,32(2H,m),6,76(1H,s),6,52-6,50(1H,m),5,91-5,86(1H,m),5,30-5,22(3H,m),5,13-5,10(2H,m),4,65-4,59(4H,m),3,99-3,97(1H,m),3,87-3,85(1H,m),3,75-3,72(5H,m),3,04-3,02(1H,m),2,28-2,13(2H,m),1,70-1,68(1H,m),1,49-1,47(3H,m),1,31-1,27(3H,m),1,11-

1,09(18H,m),1,00-0,90(15H,m),0,65-0,48(4H,m),0,06-0,03(6H,m). MS(APCI, ESI)m/z:966$(M+H)^+$

[0407]

Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6- (hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (1,75 g, 1,81 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,53 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,66(1H,s),8,50(1H,s),7,69(1H,s),7,57-7,54(2H,m),7,34-7,32(2H,m),6,75-6,71(2H,m),5,90-5,85(1H,m),5,40-5,38(1H,m),5,29-5,21(2H,m),5,12(2H,s),4,71-4,50(4H,m),4,34-4,31(1H,m),3,89-3,77(6H,m),3,64-3,61(1H,m),3,13-3,10(1H,m),2,17-2,09(1H,m),1,87-1,84(2H,m),1,48-1,46(3H,m),1,32-1,28(3H,m),1,11-1,09(18H,m),0,97-0,94(6H,m),0,63-0,49(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:852$(M+H)^+$

[0408]

Paso 7: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-{4-[({[(11'S,11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (1,53 g, 1,79 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (1,24 g, 81 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,51(1H,s),7,51-7,49(2H,m),7,18-7,15(3H,m),6,65(1H,s),6,56-6,54(1H,m),5,90-5,85(2H,m),5,31-5,19(3H,m),5,10-5,07(1H,m),4,97-4,94(1H,m),4,67-4,50(3H,m),3,90-3,88(1H,m),3,84(3H,s),3,73-3,70(1H,m),3,58-3,56(2H,m),3,31-3,28(1H,m),2,42-2,39(1H,m),2,18-2,15(1H,m),1,74-1,71(1H,m),1,48-1,46(3H,m),1,19-0,88(27H,m),0,69-0,65(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:850$(M+H)^+$

[0409]

Paso 8: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (1,24 g, 1,45 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,979 g, 70 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,48(1H,s),7,51-7,49(2H,m),7,19(1H,m),7,14-7,12(2H,m),6,62(1H,s),6,53-6,51(1H,m),6,01-5,99(1H,m),5,91-5,85(1H,m),5,30-5,28(2H,m),5,21-5,15(2H,m),4,82-4,79(1H,m),4,68-4,51(3H,m),3,88-3,84(4H,m),3,71-3,69(1H,m),3,50-3,47(1H,m),3,28-3,25(1H,m),2,37-2,34(1H,m),2,20-2,13(1H,m),1,52-1,47(4H,m),1,21-0,94(27H,m),0,80-0,77(9H,m),0,67-0,64(4H,m),0,19(3H,s),0,08(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:964$(M+H)^+$

[0410]

Paso 9: N-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-D-valil-N-{4- [({[(11a'S)-11'-{[terc-butil (dimetil) silil] oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H- espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil} oxi) metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,979 g, 1,02 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,769 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,71(1H,s),7,37-7,35(2H,m),7,23(1H,s),7,04-7,02(2H,m),6,86-6,84(1H,m),6,74-6,72(1H,m),6,65(1H,s),6,05-5,85(2H,m),5,64-5,62(1H,m),5,32-5,20(3H,m),4,82-4,78(1H,m),4,70-4,52(3H,m),4,00-3,98(1H,m),3,93-3,90(3H,m),3,73-3,70(1H,m),3,55-3,53(1H,m),3,27-3,23(1H,m),2,38-2,18(2H,m),1,60-1,46(4H,m),1,00-0,92(6H,m),0,80(9H,s),0,68-0,63(4H,m),0,20(3H,s),0,10(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:808$(M+H)^+$

[0411]

Paso 10: N-[(Prop-2-eno)-iloxi)carbonil]-D-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,100 g, 0,124 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,148 g, 94 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1284$(M+H)^+$

[0412]

Paso 11: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-D-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-

metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,148 g, 0,124 mmol) se utilizó e hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,132 g, 98 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1170$(M+H)^+$

[0413]

Paso 12: D-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi- 2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,132 g, 0,113 mmol) se utilizó e hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0963 g, 85 %)

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,12(1H,s),7,85-7,84(1H,m),7,54-7,52(1H,m),7,49(1H,s),7,44-7,42(2H,m),7,34-7,32(2H,m),7,21(1H,s),7,13-7,11(2H,m),6,90-6,88(2H,m),6,41(1H,s),6,10(1H,s),5,90-5,87(1H,m),5,35-5,32(1H,m),4,74-4,71(1H,m),4,60-4,56(2H,m),4,30(1H,s),4,13-4,10(4H,m),3,89(3H,s),3,83(3H,s),3,80(3H,s),3,74-3,71(1H,m),3,60-3,49(4H,m),3,39-3,35(1H,m),3,31-3,27(2H,m),2,75-2,72(1H,m),2,44-2,18(4H,m),1.78-1,44(6H,m),0,98-0,97(3H,m),0,74-0,68(7H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1002$(M+H)^+$

[0414]

Paso 13: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-D-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

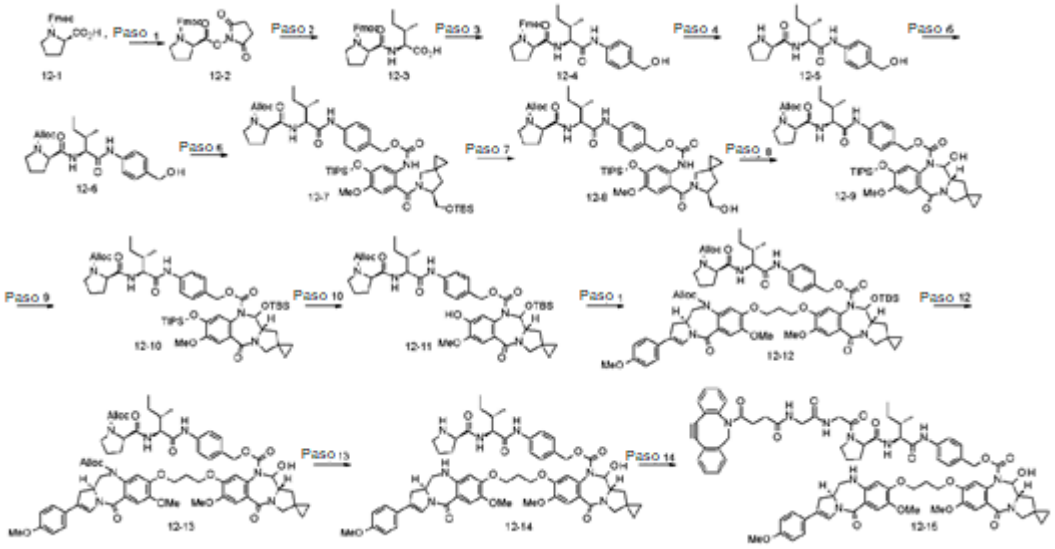
El compuesto obtenido en el paso 12 (0,0455 g, 0,0454 mmol) se utilizó e hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0416 g, 65 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1403$(M+H)^+$

[0415]

Ejemplo 12: Enlazador de fármaco 10

[Fórmula 136]



Paso 1: Compuesto 12-2

Al material de partida 12-1 (2,01 g, 5,94 mmol) en diclorometano (50 ml), se añadió clorhidrato de 1-(3- dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,37 g, 7,13 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se añadió al mismo N-hidroxisuccinimida (0,821 g, 7,13 mmol) a 0 °C. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y el disolvente se destiló a presión reducida. Se añadió acetato de etilo y agua al residuo resultante, y la capa orgánica se lavó con agua, una solución acuosa de ácido cítrico al 10 %, un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio.

El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (2,11 g, 82 %).

MS(APCI, ESI)m/z:435$(M+H)^+$

[0416]

Paso 2: Compuesto 12-3

El compuesto obtenido en el paso 1 (2,11 g, 4,85 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 10, excepto que se usó L-isoleucina en lugar de hidrocloruro de N6-[(2,2,2-tricloroetoxi)carbonil]-L-lisina, para proporcionar el compuesto deseado (2,16 g, 99 %).

MS(APCI, ESI)m/z:451$(M+H)^+$

[0417]

Paso 3: Compuesto 12-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (2,16 g, 4,85 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 5 para proporcionar el compuesto deseado (1,48 g, 56 %).

[0418]

Paso 4: Compuesto 12-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,48 g, 2,67 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 10 para proporcionar el compuesto deseado (0,794 g, 89 %).

[0419]

Paso 5: Compuesto 12-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,794 g, 2,38 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 7 para proporcionar el compuesto deseado (0,886 g, 89 %).

[0420]

Paso 6: Compuesto 12-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,794 g, 2,12 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,19 g, 72 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1006$(M+H)^+$

[0421]

Paso 7: Compuesto 12-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (1,19 g, 1,18 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,07 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:892$(M+H)^+$

[0422]

Paso 8: Compuesto 12-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (1,18 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,800 g, 76 %).

MS(APCI, ESI)m/z:890$(M+H)^+$

[0423]

Paso 9: Compuesto 12-10

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,800 g, 0,899 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,567 g, 90 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1004$(M+H)^+$

[0424]

Paso 10: Compuesto 12-11

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,567 g, 0,564 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,454 g, 94 %).

MS(APCI, ESI)m/z:848$(M+H)^+$

[0425]

Paso 11: Compuesto 12-12

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,100 g, 1,18 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,159 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:1324$(M+H)^+$

[0426]

Paso 12: Compuesto 12-13

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,118 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,139 g, 97 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1210$(M+H)^+$

[0427]

Paso 13: Compuesto 12-14

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,139 g, 0,114 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0667 g, 56 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,81(1H,s),8,21-8,19(1H,m),7,55-7,44(4H,m),7,33-7,31(2H,m),7,22(1H,s),7,13-7,11(2H,m),6,90-6,87(2H,m),6,39(1H,s),6,11(1H,s),5,89-5,87(1H,m),5,35-5,32(1H,m),4,80-4,58(2H,m),4,30(1H,s),4,22-4,07(5H,m),3,89(3H,s),3,81-3,72(9H,m),3,58-3,53(3H,m),3,38-3,31(2H,m),2,98-2,93(2H,m),2,76-2,72(1H,m),2,42-2,39(1H,m),2,18-2,12(3H,m),1,94-1,51(7H,m),1,31-1,13(1H,m),0,97-0,90(6H,m),0,71-0,66(4H,m). MS(APCI, ESI)m/z:1042$(M+H)^+$

[0428]

Paso 14: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-D-propil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-isoleucinamida

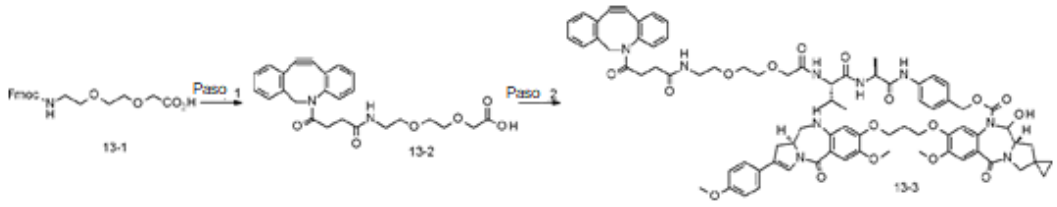
El compuesto obtenido en el paso 13 (0,0314 g, 0,0301 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0300 g, 69 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1443$(M+H)^+$

[0429]

Ejemplo 13: Enlazador de fármaco 11

[Fórmula 137]




Paso 1: [2-(2-{[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4-oxobutanoil]amino}etoxi)etoxi]acetato

A una solución de material de partida 13-1 (3,00 g, 7,78 mmol, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) en N,N-dimetilformamida (10 ml), se añadió 1,8-diazabiciclo[5.4.0]-7-undeceno (1,16 ml, 7,78 ml) y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, y luego se añadió al mismo 1-{[4-(11,12-didehidrodibenzo [b, f] azocina-5 (6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (1,10 g, 2,72 mmol) y trietilamina (1,94 ml, 14,0 mmol) a temperatura ambiente. La solución de reacción se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó luego mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a cloroformo: metanol = 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,410 g, 12 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,68-7,66(1H,m),7,55-7,53(1H,m),7,44-7,24(6H,m),6,58-6,56(1H,m),5,16-5,12(1H,m),4,16-4,11(2H,m),3,80-3,57(5H,m),3,48-3,44(2H,m),3,30-3,18(2H,m),2,90-2,86(1H,m),2,52-2,45(1H,m),2,26-2,22(1H,m),2,02-1,98(1H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:451$(M+H)^+$

[0430]

Paso 2: N-{[2-(2-{[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4-oxobutanoil]amino}etoxi)etoxi]acetil}-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'- metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a- tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

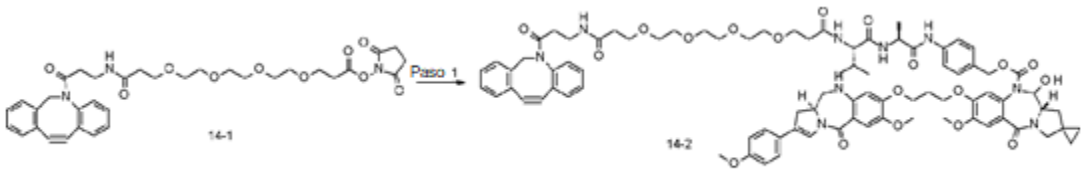
El compuesto obtenido en el paso 1 (0,050 g, 0,0499 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0590 g, 82 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1434$(M+H)^+$

[0431]

Ejemplo 14: Enlazador de fármaco 12

[Fórmula 138]




Paso 1: N-[20-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-16,20-dioxo-4,7,10,13-tetraoxa-17-azaicosan-1-oil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

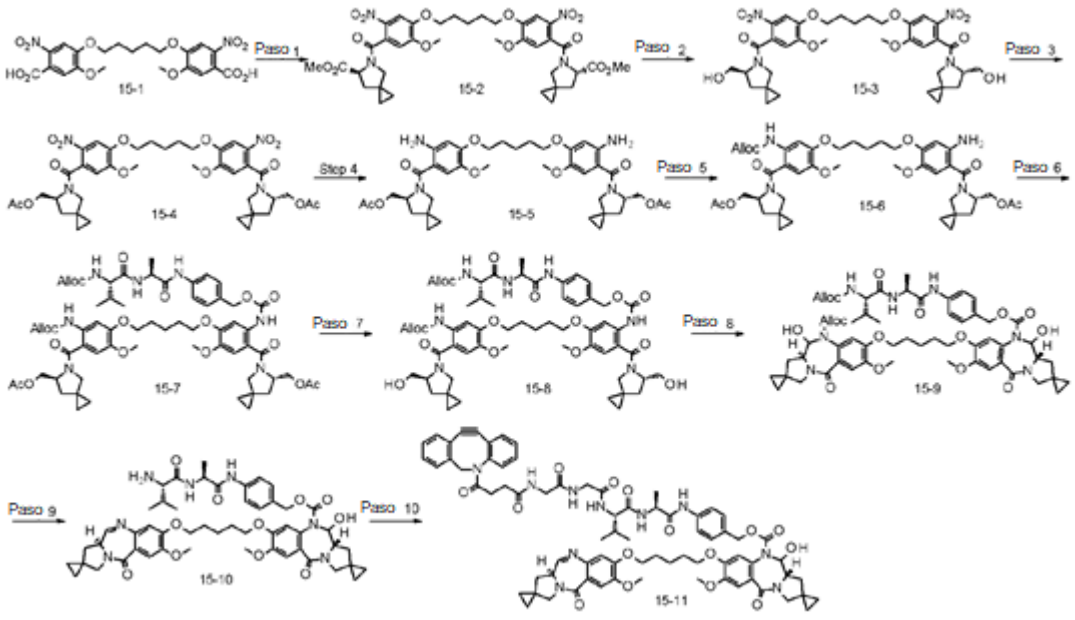
Una solución del compuesto obtenido en la etapa 11 del Ejemplo 4 (0,0500 g, 0,0499 mmol), un material de partida 14-1 (0,050 g, 0,0499 mmol, disponible en el mercado de Alfa Aesar) y una trietilamina (0,00830 ml, 0,0599 mmol) en diclorometano (3 ml) se agitaron a temperatura ambiente durante la noche. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó luego por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a cloroformo: metanol = 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,0490 g, 64 %).

MS (APCI, ESI)m/z:1536 $(M+H)^+$

[0432]

Ejemplo 15: Enlazador de fármaco 13

[Fórmula 139]



Paso 1: Dimetil (6S,6'S)-5,5'-{1,5-pentanediilbis[oxi(5-metoxi-2-nitrobenzen-4,1-diil)carbonil]}bis(5-azaspiro[2.4]heptano-6-carboxilato)

A una solución de material de partida 15-1 (5,41 g, 10,9 mmol, Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 1161) en diclorometano (50 ml), se añadió cloruro de oxalilo (5,63 ml, 65,7 mmol) a 0 °C y a la misma se añadió gota a gota N,N-dimetilformamida (0,0844 ml, 1,09 mmol). La temperatura de la solución de reacción se elevó a temperatura ambiente, y la solución de reacción se agitó durante 2 horas. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en diclorometano (100 ml), que se añadió gota a gota a una solución de diclorometano (100 ml) de clorhidrato de metil (6S)-5-azaspiro [2.4] heptano-6-carboxilato (4,28 g,
24.1 mmol, Tetrahedron Letters 2012. 53. 3847) y trietilamina (6,07 ml, 43,8 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a -40 °C. La temperatura de la solución de reacción se elevó a 0 °C y la solución de reacción se agitó durante 2 horas. A la mezcla de reacción, se añadió ácido clorhídrico 1 N (100 ml), y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (8,40 g, cuantitativo).
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,71(2H,s),6,88(2H,s),4,63(2H,m),4,15-4,12(4H,m),3,94(6H,s),3,71(6H,s),3,25(2H,m),3,10(2H,m),2,31-2,28(2H,m),1,90-1,83(6H,m),1,60-1,58(2H,m),0,71-0,49(8H,m). MS(APCI, ESI)m/z:769$(M+H)^+$.
[0433]
Paso 2: {1,5-Pentanediilbis[oxi (5-metoxi-2-nitrobenzen-4,1-diil)]}bis{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]metanona}

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (8,40 g, 10,9 mmol) en THF (100 ml), se añadió borohidruro de litio (714 mg, 32,8 mmol), y el resultante se agitó a 0 °C durante 30 minutos, y la temperatura se elevó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Después de agregar ácido clorhídrico 1 N a 0 °C, el resultante se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (7,70 g, 99 %).
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,67(2H,s),7,05(2H,s),4,86-4,74(2H,m),4,22-4,12(6H,m),3,92(6H,s),3,83-3,73(2H,m),3,62-3,51(2H,m),3,29(1H,m),3,11(2H,m),2,96(1H,m),2,12-2,03(2H,m),1,82-1,77(6H,m),1,59-1,56(2H,m),0,67-0,41(8H,m). MS(APCI, ESI)m/z:713$(M+H)^+$.
[0434]
Paso 3: Pentan-1,5-diilbis[oxi (5-metoxi-2-nitrobenzen-4,1-diil)carbonil (6*S*)-5-azaspiro[2.4]heptan-5,6-diilmetanediil] diacetato

El compuesto obtenido en la etapa 2 (7,70 g, 10,8 mmol) se disolvió en piridina (20 ml) y anhídrido acético (10 ml, 105,9 mmol), que se agitó a temperatura ambiente. El resultante se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (8,38 g, 97 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,68(2H,s),7,03(2H,s),4,47-4,46(2H,m),4,36-4,27(4H,m),4,13-4,11(6H,m),3,92(6H,s),3,16(2H,m),2,98(2H,m),2,17(1H,m),2,06(6H,s),1,84(4H,m),1,68(1H,m),1,58(2H,m),0,64-0,45(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:797$(M+H)^+$.

[0435]

Paso 4: 1,5-Pentanediilbis[oxi (2-amino-5-metoxibenzen-4,1-diil)carbonil (6S)-5-azaspiro[2.4]heptan-5,6-diilmetanediil] diacetato

A una solución del compuesto obtenido en el paso 3 (8,28 g, 10,4 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml), se añadió carbono de paladio al 5% (contenido de humedad: 54 %, 1,00 g) y la solución de reacción se agitó vigorosamente entonces bajo la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 6 horas. El resultante se filtró a través de un Celite, y el filtrado se destiló luego a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (5,05 g, 66 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:6,66(2H,s),6,36(2H,s),5,11(4H,s),4,49(2H,s),4,19(4H,m),3,90(4H,m),3,62(6H,s),3,48-3,46(2H,m),3,33(2H,s),3,23-3,20(2H,m),2,01(6H,s),1,78-1,74(6H,m),1,55(2H,m),0,61-0,58(4H,m),0,49-0,48(4H,m). MS(APCI, ESI)m/z:737$(M+H)^+$.

[0436]

Paso 5: (Forma monoaliloxicarbonila) acetato de metilo de {(6*S*)-5-[4-({5-[4-({(6*S*)-6-[(Acetiloxi)metil]-5-azaspiro[2.4]hept-5- il}carbonil)-5-amino-2-metoxifenoxi]pentil}oxi)-5-metoxi-2-{[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]amino}benzoil]-5-azaspiro[2.4]hept-6-il}

A una solución del compuesto obtenido en el paso 4 (5,05 g, 6,85 mmol) en diclorometano (100 ml), se añadió piridina (1,10 ml, 13,7 mmol) y se añadió a la misma cloroformiato de alilo (0,725 ml, 6,85 mmol) bajo la atmósfera de nitrógeno a -78 °C, y el resultante se agitó durante 2 horas. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 70:30 (v/v) a 100:0 (v/v), cloroformo: metanol = 100: 0 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar la forma bisaliloxicarbonila (1,36 g, 22 %) y la forma monoaliloxicarbonila (2,63 g, 47 %) como el compuesto deseado.

(Forma bisaliloxicarbonila) Diacetato de pentan-1,5-diilbis[oxi (5-metoxi-2-{[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]amino}benzen- 4,1-diil)carbonil (6*S*)-5-azaspiro[2.4]heptan-5,6-diilmetanediil]:

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,14(2H,s),7,14(2H,s),6,85(2H,s),5,94(2H,m),5,33(2H,m),5,21(2H,m),4,55(4H,m),4,47(1H,s),4,23(3H,s),3,96(4H,m),3,74(6H,s),3,34(6H,s),3,31(2H,m),3,21(2H,m),2,04(6H,s),1,79(4H,m),1,67(2H,m),1,56(2H,m),0,56-0,48(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:905$(M+H)^+$.

Forma monoaliloxicarbonila:

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)

δ:9,14(1H,s),7,14(1H,s),6,85(1H,s),6,65(1H,s),6,35(1H,s),5,95(1H,m),5,33(1H,m),5,22(1H,m),5,11(2H,s),4,55(2H,m),4,48(2H,s),4,23-4,14(4H,m),3,96(2H,m),3,90(2H,m),3,74(3H,s),3,63(3H,s),3,49(1H,m),3,38-3,30(4H,m),3,21(1H,m),2,04(3H,s),2,01(3H,s),1,77(5H,m),1,68(1H,m),1,56(2H,m),0,63-0,48(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:821$(M+H)^+$.

[0437]

Paso 6: N-[(2-Propen-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[2-({(6S)-6-[(acetiloxi)metil]-5-azaspiro[2.4]hept-5-il}carbonil)-5-({5-[4-({(6S)-6-[(acetiloxi)metil]-5-azaspiro[2.4]hept-5-il}carbonil)-2-metoxi-5-{[(2-propen-1-iloxi)carbonil]amino}fenoxi]pentil}oxi)-4- metoxifenil]carbamoil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

La forma monoaliloxicarbonila obtenida en la etapa 5 (2,00 g, 2,44 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en la etapa 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,64 g, 89 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,02(1H,s),9,14(2H,s),8,18(1H,m),7,59(2H,m),7,33(2H,m),7,27(1H,m),7,14(2H,s),6,85(2H,s),5,99-5,86(2H,m),5,31(2H,n),5,19(2H,m),5,03(2H,s),4,55(2H,m),4,48(2H,n),4,41(2H,m),4,23-4,21(3H,m),3,94-3,91(4H,m),3,88-3,86(2H,m),3,74(3H,s),3,74(3H,s),3,34(4H,s),3,32-3,30(2H,m),3,20-3,18(2H,m),2,03(6H,s),1,96(1H,m),1,79(4H,s),1,66(1H,m),1,55(2H,s),1,30(3H,m),0,88(3H,m),0,83(3H,m),0,54-0,49(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1224$(M+H)^+$.

[0438]

Paso 7: N-[(2-Propen-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-

5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-5-{[5-(4-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5- azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-2-metoxi-5-{[(2-propen-1-iloxi)carbonil]amino}fenoxi)pentil]oxi}-4-metoxifenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 6 (2,64 g, 2,16 mmol) en metanol (10 ml), se añadió carbonato de potasio (1,49 g, 10,8 mmol) y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción, se añadió un cloruro de amonio acuoso saturado (100 ml), que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (2,21 g, 90 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,04(1H,s),9,18(1H,s),8,18(1H,m),7,59(2H,m),7,33(2H,m),7,26(1H,m),7,22(1H,s),7,14(2H,s),6,89(2H,s),5,98-5,86(2H,m),5,31(2H,m),5,19(2H,m),5,04(2H,s),4,80(2H,m),4,55(2H,m),4,48(2H,m),4,41(1H,m),4,26(2H,s),3,96-3,94(4H,m),3,90-3,85(1H,m),3,74(6H,s),3,59(2H,m),3,33(6H,s),3,09(1H,m),1,93-1,83(8H,m),1,57-1,54(2H,m),1,30(3H,m),0,88(3H,m),0,83(3H,m),0,52-0,43(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1140$(M+H)^+$.

[0439]

Paso 8: N-[(2-Propen-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-8'-{[5-({(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-10'-[(2-propen-1-iloxi)carbonil]- 5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-8'-il}oxi)pentil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en la etapa 7 (2,03 g, 1,78 mmol) en diclorometano (50 ml), se añadió periodinano Dess-Martin (1,59 g, 3,74 mmol) y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche.Se añadió un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) a la mezcla de reacción, que se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (2,05 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,99(1H,s),8,16(1H,m),7,54(2H,m),7,32-7,22(3H,m),7,08-7,04(2H,m),6,80-6,72(2H,m),6,55(2H,s),5,94-5,86(2H,m),5,75(2H,m),5,31-5,04(2H,m),4,81(1H,m),4,62(1H,m),4,48-4,38(4H,m),4,00-3,87(4H,m),3,79-3,76(7H,m),3,54(2H,m),3,42-3,40(2H,m),3,33(4H,s),3,14(2H,m),2,35(2H,m),1,80-1,78(4H,m),1,59-1,56(4H,m),1,29(3H,m),0,87(3H,m),0,83(3H,m),0,70-0,59(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1136$(M+H)^+$.

[0440]

Paso 9: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (2,05 g, 1,80 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,02 g, 60 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,08(1H,s),7,57(2H,m),7,32-7,20(3H,m),7,05(2H,s),6,68-6,60(3H,m),5,74(1H,m),4,99-4,58(4H,m),3,99-3,94(4H,m),3,78-3,73(6H,m),3,66-3,38(4H,m),3,15-3,01(3H,m),2,40-2,34(3H,m),1,89-1,81(6H,m),1,57-1,53(4H,m),1,28(3H,m),0,88(3H,m),0,78(3H,m),0,64-0,55(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:950$(M+H)^+$.

[0441]

Paso 10: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo [b,f] azocin-5 (6H)-il) -4-oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N- {4-[({[((11a'S) -11'-hidroxi-7'-metoxi-8'- [(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi] -5'-oxo-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiazepina] -10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,710 g, 0,747 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 2 (0,313 g, 0,747 mmol) se disolvieron en un disolvente mixto de diclorometano (1,5 ml) y metanol (0,1 ml). A esto, se añadió cloruro de 4- (4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (0,264 g, 0,897 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora.El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a 80:20 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,671 g , 66 %).

Tabla 2: Posiciones máximas de RMN de protón y MS para el enlazador de fármacos 13

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9.91(1H,s),8.32(1H,s),8.23-7.91(3H,m),7,81-7,19(14H,m),7,04(1H,m),6,80-6,62(3H,m),5,77-5,75(1H,m),5,20(1H,m),5,01(1H,m),4,79(1H,m),4,46-4,35(1H,m),4,04(4H,m),3,86-3,38(18H,m),3,22-3,15(2H,m),2,67-2,63(1H,m),2,46-2,23(3H,m),2,09-1,91(2H,m),1,80-1,78(5H,m),1,57(3H,m),1,27(3H,s),1,11-1,04(1H,m),0,87-

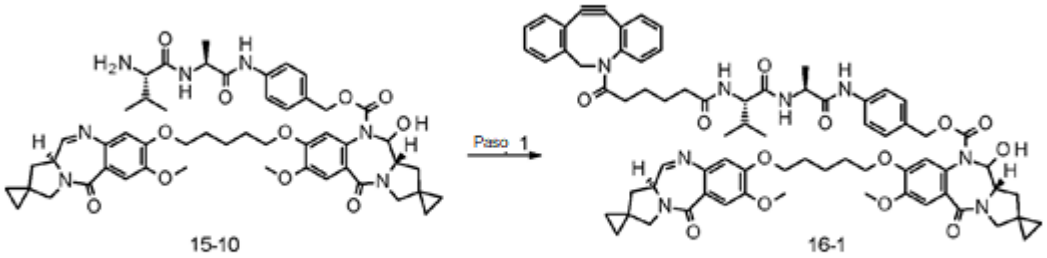
0,79(6H,m),0,63-0,55(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1351$(M+H)^+$.

[0442]

Ejemplo 16: Enlazador de fármaco 14

[Fórmula 140]




Paso 1: N-[6-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-6-oxohexanoil]-L-valil- N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',11a'- dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-8'- il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 del Ejemplo 15 (0,100 g, 0,105 mmol) y el ácido azadibenzociclooctinoico (0,0351 g, 0,105 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (0,0702 g, 53 %).

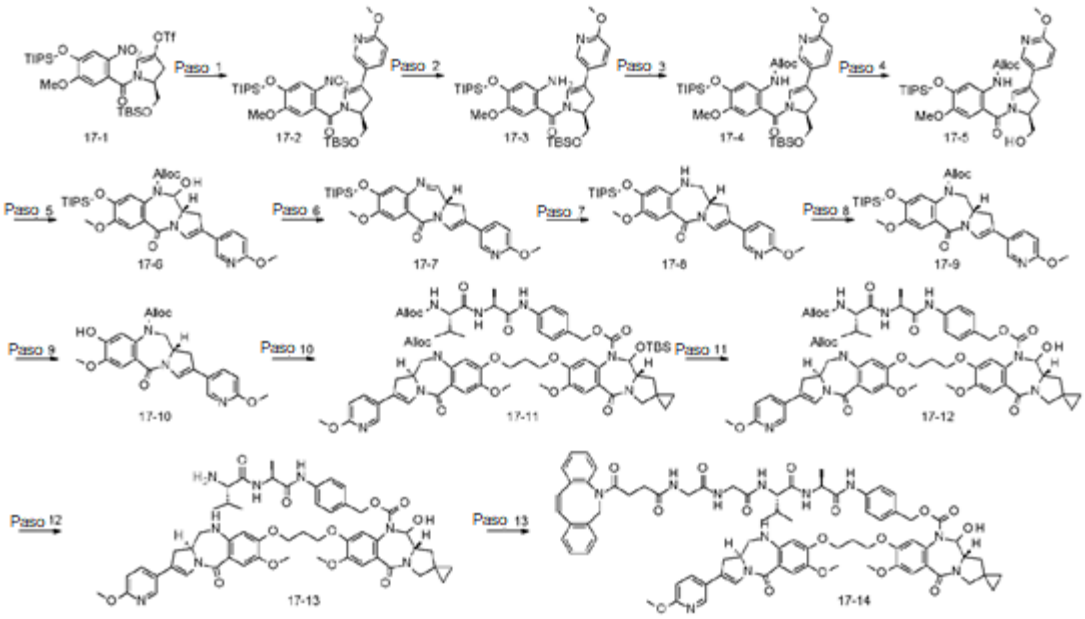
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,92(1H,s),8,14(1H,m),7,92-7,19(16H,m),7,04(1H,m),6,86-6,72(1H,m),6,60-6,58(1H,m),5,76(1H,m),5,20(1H,m),5,03(1H,m),4,81-4,78(1H,m),4,43-4,37(2H,m),4,11-3,41(14H,m),3,21-3,15(3H,m),2,43-2,37(2H,m),2,19-2,15(1H,m),2,03-1,92(3H,m),1,77-1,75(5H,m),1,55(4H,s),1,26-1,18(6H,m),1,09-1,04(1H,m),0,87-0,77(6H,m),0,69-0,50(8H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1265$(M+H)^+$.

[0443]

Ejemplo 17: Enlazador de fármaco 15

[Fórmula 141]



Paso 1: Compuesto 17-2

La materia prima de partida 17-1 (2,00 g, 2,81 mmol, WO 2013053872) y el 2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) piridina (2,00 g, 8,51 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,89 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:672$(M+H)^+$.

[0444]

Paso 2: Compuesto 17-3

El compuesto obtenido en el paso 1 (1,89 g, 2,81 mmol) se disolvió en un disolvente mixto de etanol (30 ml y ácido fórmico (1,5 ml). A esto se añadió polvo de zinc (3,68 g), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se filtró a través de un Celite y un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) se añadió al filtrado, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (1,81 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:642$(M+H)^+$.

[0445]

Paso 3: Compuesto 17-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (1,81 g, 2,82 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,76 g, 86 %).

MS(APCI, ESI)m/z:726$(M+H)^+$.

[0446]

Paso 4: Compuesto 17-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,76 g, 2,42 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,05 g, 71 %).

MS(APCI, ESI)m/z:612$(M+H)^+$.

[0447]

Paso 5: Compuesto 17-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,05 g, 1,71 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (0,686 g, 66 %).

MS(APCI, ESI)m/z:610$(M+H)^+$.

[0448]

Paso 6: Compuesto 17-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,481 g, 0,789 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,288 g, 72 %).

MS(APCI, ESI)m/z:508$(M+H)^+$.

[0449]

Paso 7: Compuesto 17-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,288 g, 0,567 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,268 g, 93 %).

MS(APCI, ESI)m/z:510$(M+H)^+$.

[0450]

Paso 8: Compuesto 17-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,267 g, 0,525 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,278 g, 89 %).

MS(APCI, ESI)m/z:594$(M+H)^+$.

[0451]

Paso 9: Compuesto 17-10

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,278 g, 0,468 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,207 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:438$(M+H)^+$.

[0452]

Paso 10: Compuesto 17-11

Con el uso del compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,307 g, 0,331 mmol), el compuesto obtenido en el paso 9 (0,0964 g, 0,220 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,224 g, 79 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1285$(M+H)^+$.

[0453]

Paso 11: Compuesto 17-12

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,294 g, 0,228 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,284 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:1171$(M+H)^+$.

[0454]

Paso 12: Compuesto 17-13

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,284 g, 0,242 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,114 g, 47 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1003$(M+H)^+$.

[0455]

Paso 13: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[7- metoxi-2-(6-metoxi-3-piridinil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,114 g, 0,113 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0121 g, 8 %).

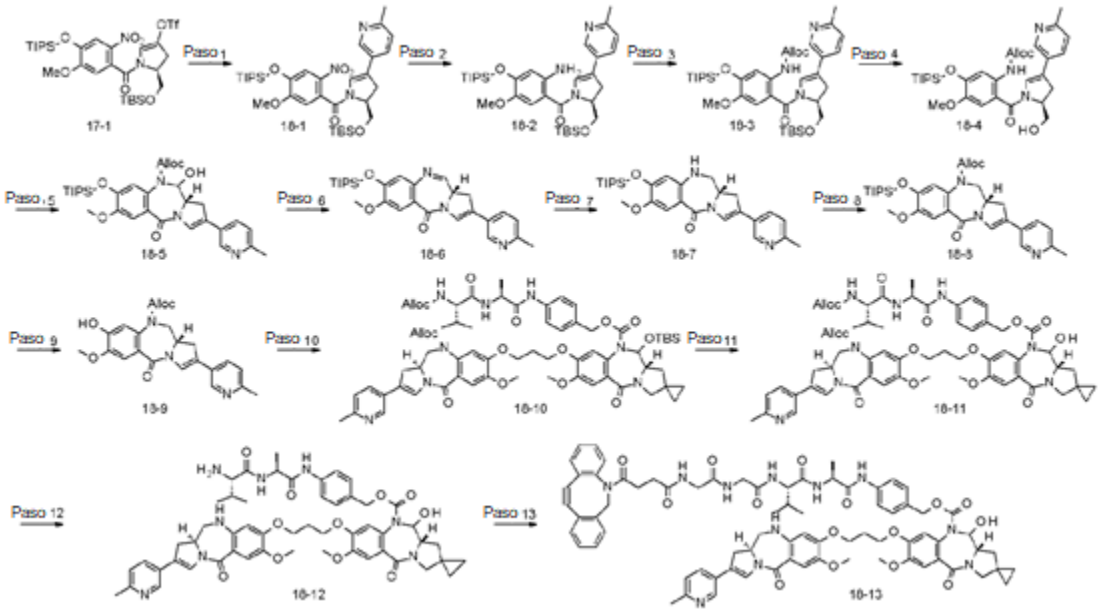
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,75(1H,s),8,24-8,09(2H,m),7,85-6,98(13H,m),6,75-6,73(2H,m),6,57-6,47(1H,m),6,18(1H,s),5,89(1H,s),5,37-4,96(3H,m),4,67-4,60(3H,m),4,41-4,06(6H,m),3,92(3H,s),3,86-3,82(3H,m),3,74-3,70(3H,m),3,59-3,45(3H,m),3,32-3,23(2H,m),2,81-2,64(3H,m),2,28-2,04(4H,m),1,49-1,38(4H,m),1,23-1,22(2H,m),1,09-1,01(3H,m),0,96-0,90(5H,m),0,69-0,64(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1404$(M+H)^+$.

[0456]

Ejemplo 18: Enlazador de fármaco 16

[Fórmula 142]



Paso 1: Compuesto 18-1

La materia prima de partida 17-1 (2,00 g, 2,81 mmol) y el ácido 2-metil-5-piridinilborónico (1,00 g, 7,30 mmol) se usaron y sometieron a reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,901 g, 49 %).

MS(APCI, ESI)m/z:656$(M+H)^+$.

[0457]

Paso 2: Compuesto 18-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (1,98 g, 3,02 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 17 para proporcionar el compuesto deseado (1,86 g, 98 %).

MS(APCI, ESI)m/z:626$(M+H)^+$.

[0458]

Paso 3: Compuesto 18-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (1,86 g, 2,97 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,36 g, 65 %).

MS(APCI, ESI)m/z:710$(M+H)^+$.

[0459]

Paso 4: Compuesto 18-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,36 g, 2,42 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,991 g, 87 %).

MS(APCI, ESI)m/z:596$(M+H)^+$.

[0460]

Paso 5: Compuesto 18-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,991 g, 1,66 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (0,608 g, 62 %).

MS(APCI, ESI)m/z:594$(M+H)^+$.

[0461]

Paso 6: Compuesto 18-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,405 g, 0,682 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,239 g, 71 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:8,60(1H,s),8,02(1H,m),7,87(1H,m),7,67(1H,s),7,62(1H,m),7,57-7,54(1H,m),7,40(1H,s),7,25(1H,m),6,74(1H,s),4,53-4,49(1H,m),3,85(3H,s),3,52(2H,m),2,46(3H,s),1,30-1,24(3H,m),1,07-1,06(18H,m), observado como un aducto de agua del compuesto deseado.

MS(APCI, ESI)m/z:492$(M+H)^+$.

[0462]

Paso 7: Compuesto 18-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,239 g, 0,485 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,180 g, 75 %).

MS(APCI, ESI)m/z:494$(M+H)^+$.

[0463]

Paso 8: Compuesto 18-8

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,180 g, 0,364 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,179 g, 85 %).

MS(APCI, ESI)m/z:578$(M+H)^+$.

[0464]

Paso 9: Compuesto 18-9

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,179 g, 0,309 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,137 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI)m/z:422$(M+H)^+$.

[0465]

Paso 10: Compuesto 18-10

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,0780 g, 0,185 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3, excepto que se usó el compuesto obtenido

en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,258 g, 0,278 mmol) en lugar del compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 1, para proporcionar el compuesto deseado (0,213 g, 91 %).
MS(APCI, ESI)m/z:1269$(M+H)^+$,

[0466]

Paso 11: Compuesto 18-11

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,213 g, 0,168 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,182 g, 94 %).
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,00-9,85(1H,m),8,54(1H,s),8,32(1H,m),8,16(1H,s),7,82(1H,m),7,65-7,56(3H,m),7,35-7,06(6H,m),6,79(1H,m),6,57(1H,s),5,87-5,80(3H,m),5,26-5,09(5H,m),4,85-4,83(1H,m),4,56-4,40(5H,m),4,13(5H,m),3,92-3,87(2H,m),3,80(5H,s),3,58-3,54(1H,m),3,21-3,09(3H,m),2,81(1H,m),2,45(3H,s),2,36-2,34(1H,m),2,16-2,10(2H,m),1,98-1,92(1H,m),1,57(2H,m),1,30-1,28(4H,m),0,92-0,84(7H,m),0,67-0,62(4H,m).
MS(APCI, ESI)m/z:1155$(M+H)^+$,

[0467]

Paso 12: Compuesto 18-12

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,182 g, 0,157 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0751 g, 48 %).
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:10,15(1H,s),8,54(1H,m),8,50(1H,s),7,78(1H,m),7,67(1H,s),7,57(2H,m),7,30(1H,s),7,21-7,19(3H,m),7,05(1H,s),6,77(1H,s),6,60-6,56(2H,m),6,35(1H,s),5,91-5,83(2H,m),5,76(1H,m),5,29-5,13(4H,m),4,84(1H,m),4,54-4,49(1H,m),4,19-4,03(4H,m),3,79(3H,s),3,65(3H,s),3,57-3,53(2H,m),3,42-3,40(1H,m),3,28-3,26(1H,m),3,14(1H,m),2,81(1H,m),2,44(3H,s),2,37-2,33(1H,m),2,21-2,01(3H,m),1,57(1H,m),1,30-1,26(3H,m),0,93-0,83(6H,m),0,67-0,61(4H,m).
MS(APCI, ESI)m/z:987$(M+H)^+$,

[0468]

Paso 13: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[7- metoxi-2-(6-metil-3-piridinil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,0751 g, 0,0761 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0117 g, 11 %).

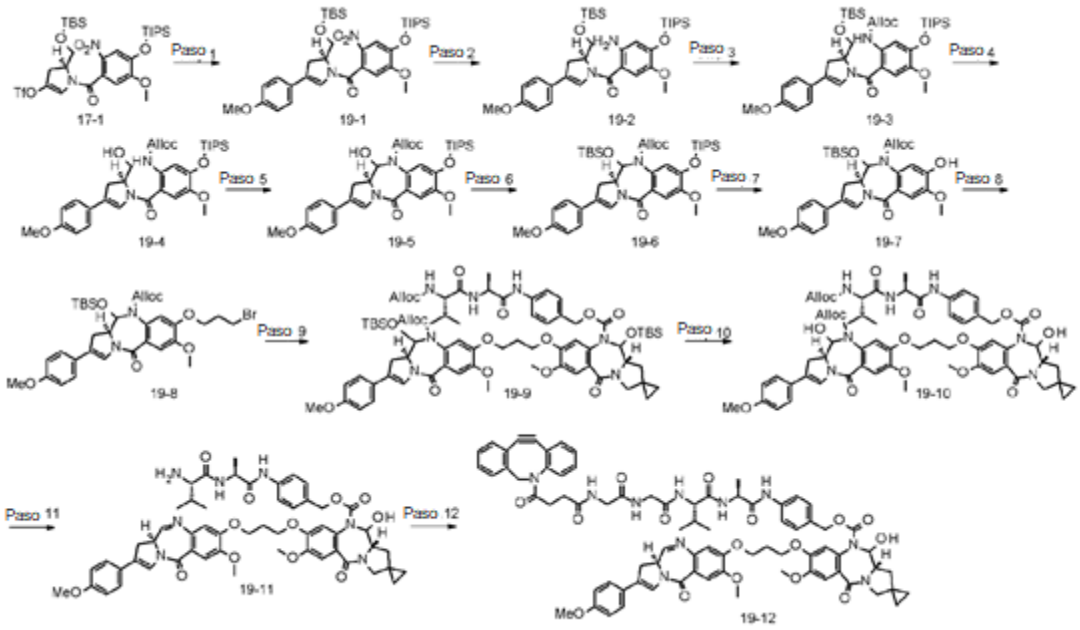
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,75(1H,s),8,48-8,46(1H,m),7,69-7,56(4H,m),7,47-6,89(14H,m),6,45(1H,m),6,24-6,19(1H,m),5,91(1H,m),5,37(1H,m),5,01(1H,m),4,67-4,59(3H,m),4,30-3,19(22H,m),2,88-2,63(3H,m),2,55(3H,s),2,42-2,34(2H,m),2,27-2,04(4H,m),1,51-1,34(4H,m),1,12-1,06(3H,m),0,99-0,84(3H,m),0,71-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1388$(M+H)^+$,

[0469]

Ejemplo 19: Enlazador de fármaco 17

[Fórmula 143]




Paso 1: [(2S)-2-({[terc-Butil(dimetil)silil]oxi}metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3- dihidro-1H-pirrol-1-il] (5-metoxi-2-nitro-4-{[tri(propan-2- il)silil]oxi}fenil)metanona

El material de partida 17-1 (2,00 g, 2,81 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,31 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,75-7,73(1H,m),7,12(2H,m),6,82-6,76(4H,m),6,13-6,11(1H,m),4,80-4,70(1H,m),3,93-3,91(3H,m),3,79-3,75(4H,m),3,21-3,15(1H,m),3,01-2,93(1H,m),1,34-1,25(3H,m),1,12(18H,m),0,89(9H,s),0,13--0,18(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:671$(M+H)^+$

[0470]

Paso 2: (2-Amino-5-metoxi-4-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)[(2S)-2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il] metanona

El compuesto obtenido en el paso 1 (1,31 g, 1,95 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 17 para proporcionar el compuesto deseado (1,12 g, 90 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,21-7,18(2H,m),6,85-6,81(2H,m),6,79-6,76(2H,m),6,28(1H,s),4,42(2H,m),3,98-3,93(1H,m),3,90-3,86(1H,m),3,80(3H,s),3,71(3H,s),3,11(1H,m),2,98(1H,m),1,32-1,23(4H,m),1,12-1,10(18H,m),0,85(9H,s),0,08-0,02(6H,m).

[0471]

Paso 3: Prop-2-en-1-il (2-{[(2S)-2-({[terc-butil(dimeti)silil]oxi}meti)-4-(4- metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2- il)silil]oxi}fenil)carbamato

El compuesto obtenido en el paso 2 (1,12 g, 1,59 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,890 g, 77 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,57(1H,m),7,77(1H,m),7,18(2H,m),6,86-6,78(4H,m),5,95-5,90(1H,m),5,32(1H,m),5,20(1H,m),4,79-4,77(1H,m),4,64-4,57(2H,m),4,00-3,98(1H,m),3,93-3,91(1H,m),3,80(3H,s),3,76(3H,s),3,14-3,09(1H,m),3,00(1H,m),1,36-1,25(3H,m),1,14-1,11(18H,m),0,85(9H,s),0,11-0,03(6H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:725$(M+H)^+$

[0472]

Paso 4: Prop-2-en-1-il (2-{[(2S)-2-(hidroximeti)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro- 1H-pirrol-1-il]carbonil}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamato

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,890 g, 1,23 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,696 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,54-8,36(1H,m),7,71(1H,m),7,18-7,17(2H,m),6,86-6,84(3H,m),6,77(1H,m),5,94-5,90(1H,m),5,32(1H,m),5,21(1H,m),4,87-4,85(1H,m),4,61(2H,m),4,50(1H,m),3,96-3,84(2H,m),3,80(3H,s),3,76(3H,s),3,28(1H,m),2,64(1H,m),1,36-1,25(3H,m),1,13(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:611$(M+H)^+$

[0473]

Paso 5: Prop-2-en-1-il (11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-8-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin- 10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,696 g, 1,14 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,532 g, 77 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,36(1H,s),7,31-7,29(2H,m),7,22(1H,s),6,90-6,87(2H,m),6,72(1H,m),5,82-5,76(2H,m),5,19-5,14(2H,m),4,60(1H,m),4,49-4,46(1H,m),3,98-3,96(1H,m),3,86(3H,s),3,82(3H,s),3,44(1H,m),3,36(1H,m),3,05(1H,m),1,28-1,21(3H,m),1,10-1,07(18H,m). MS(APCI, ESI)m/z:609$(M+H)^+$

[0474]

Paso 6: Prop-2-en-1-il (11aS)-11-{[terc-butil(dimeti)silil]oxi}-7-metoxi-2-(4- metoxifenil)-5-oxo-8-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,532 g, 0,874 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,532 g, 95 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,29(2H,m),7,23(1H,s),6,89(2H,m),6,70(1H,s),5,90(1H,m),5,76(1H,m),5,14-5,10(2H,m),4,60(1H,m),4,38(1H,m),3,93-3,85(1H,m),3,87(3H,s),3,82(3H,s),3,32(1H,m),2,82-2,78(1H,m),1,29-1,22(3H,m),1,12-1,07(18H,m),0,89(9H,s),0,27(3H,s),0,20(3H,s). MS(APCI, ESI)m/z:723$(M+H)^+$

[0475]

Paso 7: Prop-2-en-1-il (11aS)-11-{[terc-butil(dimeti)silil]oxi}-8-hidroxi-7- metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,532 g, 0,756 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,359 g, 86 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,34(1H,s),7,30-7,27(3H,m),6,90-6,88(2H,m),6,76(1H,s),5,93-5,90(2H,m),5,81-5,73(1H,m),5,12-5,08(2H,m),4,61(1H,m),4,42(1H,m),3,97(3H,s),3,93-3,88(1H,m),3,83(3H,s),3,31(1H,m),2,83-2,79(1H,m),0,91(9H,s),0,27(3H,s),0,22(3H,s). MS(APCI, ESI)m/z:567$(M+H)^+$

[0476]

Paso 8: Prop-2-en-1-il (11aS)-8-(3-bromopropoxi)-11-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}- 7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,405 g, 0,715 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,490 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,29(2H,m),6,89(2H,m),6,69(1H,s),5,94(1H,m),5,82-5,75(1H,m),5,13-5,08(1H,m),5,13-5,08(2H,m),4,65(1H,m),4,41(1H,m),4,20-4,13(2H,m),3,94-3,88(1H,m),3,92(3H,s),3,83(3H,s),3,62(2H,m),3,32(1H,m),2,83-2,80(1H,m),2,41-2,36(2H,m),0,91(9H,s),0,27(3H,s),0,24(3H,s).

MS(APCI, ESI)m/z:687$(M+H)^+$

[0477]

Paso 9: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-8'-[3-({(11aS)-11-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2- en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,490 g, 0,713 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,600 g, 60 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1414$(M+H)^+$

[0478]

Paso 10: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-8'-[3-({(11aS)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il}oxi)propoxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'- pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L- alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,600 g, 0,424 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,500 g, 99 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1184$(M-H)^+$

[0479]

Paso 11: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi- 2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8- il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1- c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,500 g, 0,421 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,113 g, 27 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,94(1H,s),7,70(1H,s),7,56-7,53(2H,m),7,46-7,44(2H,m),7,36(1H,s),7,31(2H,m),7,23(1H,s),7,03(2H,m),6,90-6,88(2H,m),6,68(1H,m),6,57(1H,s),6,40(1H,s),5,92(1H,m),5,43(1H,m),4,67(1H,m),4,55-4,53(1H,m),4,46(1H,m),4,35-4,33(1H,m),4,28-4,24(1H,m),4,15-4,13(1H,m),3,88(3H,s),3,87(3H,s),3,83(3H,s),3,77-3,72(1H,m),3,62-3,60(1H,m),3,52-3,47(2H,m),3,34(1H,m),3,30-3,28(1H,m),3,00-2,91(2H,m),2,50-2,41(2H,m),2,24-2,22(1H,m),2,10-2,08(1H,m),1,77-1,75(1H,m),1,40-1,37(1H,m),1,16(3H,m),0,82(3H,m),0,76-0,62(4H,m),0,69(3H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1000$(M+H)^+$

[0480]

Paso 12: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H- espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)- il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

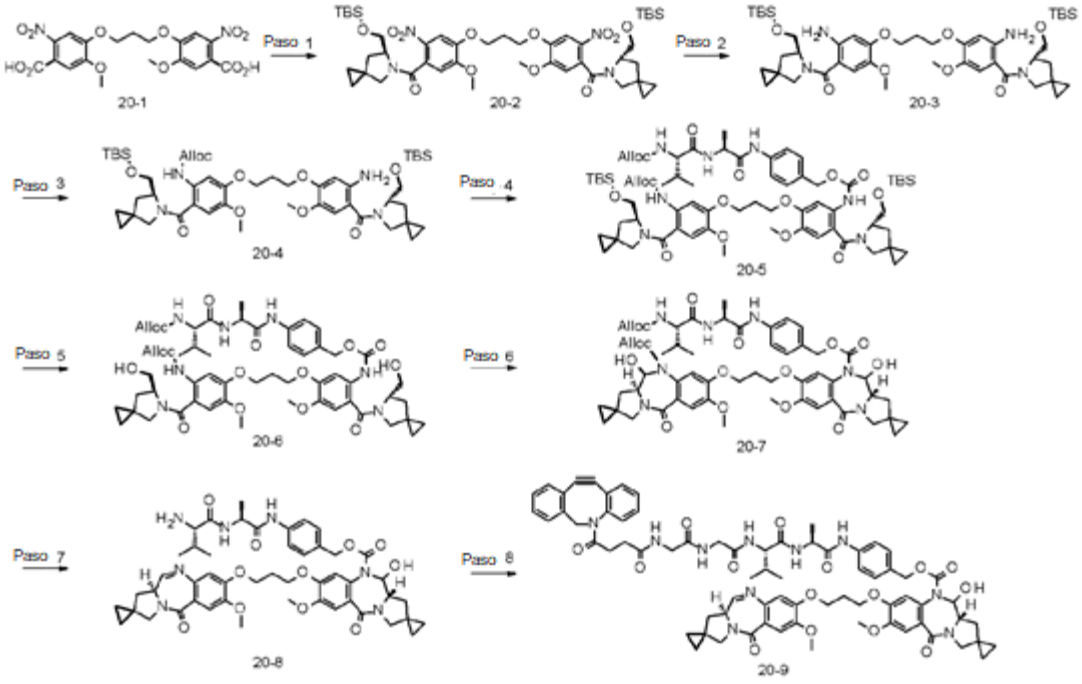
El compuesto obtenido en el paso 11 (0,157 g, 0,157 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,120 g, 49 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1401$(M+H)^+$

[0481]

Ejemplo 20: Enlazador de fármaco 18

[Fórmula 144]



Paso 1: {Propan-1,3-diilbis[oxi (5-metoxi-2-nitrobenzen-4,1-diil)]}bis{[(6S)-6- ({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]metanona}

La materia prima de partida 20-1 (3,00 g, 6,43 mmol, Journal of the American Chemical Society 1992, 13, 4939) y el compuesto obtenido en el paso 3 del Ejemplo 1 (3,42 g, 14,2 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en etapa 1 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (3,74 g, 64 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,79-7,70(2H,m),6,83-6,75(2H,m),4,52-4,50(1,5H,m),4,35-4,29(4,5H,m),4,03(0,5H,m),3,97-3,92(6H,m),3,88(0,5H,m),3,60-3,52(1H,m),3,38-3,33(0,5H,m),3,26-3,24(0,5H,m),3,04-2,93(3H,m),2,45-2,39(2H,m),2,25-2,21(1H,m),2,09-1,98(1H,m),1,68(1H,m),1,56(1H,m),0,93-0,90(14H,m),0,77-0,74(4H,m),0,71-0,62(4H,m),0,57-0,49(4H,m),0,44-0,40(2H,m),0,11(9H,m),-0,14(3H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:912$(M+H)^+$

[0482]

Paso 2: {Propan-1,3-diilbis[oxi (2-amino-5-metoxibenzen-4,1-diil)]}bis{[(6S)-6- ({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]metanona}}

El compuesto obtenido en el paso 1 (3,74 g, 4,10 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 4 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (2,97 g, 85 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,79-7,69(2H,m),6,82-6,75(2H,m),4,54-4,47(1,5H,m),4,36-4,26(4,5H,m),4,03(0,5H,m),3,98-3,92(6H,m),3,88(0,5H,m),3,61-3,51(1H,m),3,39-3,32(0,5H,m),3,28-3,21(0,5H,m),3,05-2,93(3H,m),2,45-2,39(2H,m),2,24-2,21(1H,m),2,08-2,06(1H,m),2,00-1,99(1H,m),1,69-1,66(1H,m),1,57-1,54(5H,m),0,94-0,88(14H,m),0,78-0,74(4H,m),0,71-0,62(4H,m),0,57-0,49(4H,m),0,44-0,40(2H,m),0,13-0,10(9H,m),-0,11--0,17(3H,m). MS(APCI, ESI)m/z:853$(M+H)^+$

[0483]

Paso 3: Prop-2-en-1-il (5-[3-(5-amino-4-{[(6S)-6-({[terc- butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-2- metoxifenil)propoxi]-2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5- azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxifenil)carbamato

El compuesto obtenido en el paso 2 (2,97 g, 3,48 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (0,549 g, 17 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,18(1H,m),7,88(1H,m),6,80(1H,m),6,73(1H,s),6,31(1H,s),5,96(1H,m),5,36(1H,m),5,24(1H,m),4,68-4,59(4H,m),4,59-4,43(2H,m),4,27-4,25(2H,m),4,20-4,18(2H,m),4,00(2H,m),3,79-3,72(9H,m),3,05(1H,m),2,35(2H,m),2,32-2,19(2H,m),1,78-1,50(4H,m),0,99-0,89(20H,m),0,67-0,54(4H,m),0,50-

0,48(2H,m),0,05(12H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1021$(M+H)^+$

[0484]

Paso 4: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-5-[3-(4-{[(6S)-6- ({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-2- metoxi-5-{[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]amino}fenoxi)propoxi]-4- metoxifenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,549 g, 0,586 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,402 g, 51 %).

MS (APCI, ESI)m/z:1341 $(M+H)^+$

[0485]

Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-5-[3-(4-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5- azaspiro[2.4]hept-5-il]carbonil}-2-metoxi-5-{[(prop-2-en-1- iloxi)carbonil]amino}fenoxi)propoxi]-4-metoxifenil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,402 g, 0,300 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,282 g, 85 %).

MS (APCI, ESI)m/z:1120 $(M+H)^+$

[0486]

Paso 6: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-8'-[3-({(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-10'-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]- 5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-8'-il}oxi)propoxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,282 g, 0,253 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,0600 g, 21 %).

MS(APCI, ESI)m/z:1106$(M-H)^+$

[0487]

Paso 7: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11a'S)-7'-metoxi- 5'-oxo-5',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]- 8'-

il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,0600 g, 0,0541 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0347 g, 70 %).

MS (APCI, ESI)m/z:922 $(M+H)^+$

[0488]

Paso 8: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5 (6H)-il)-4- oxobutanoil]glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-8'-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

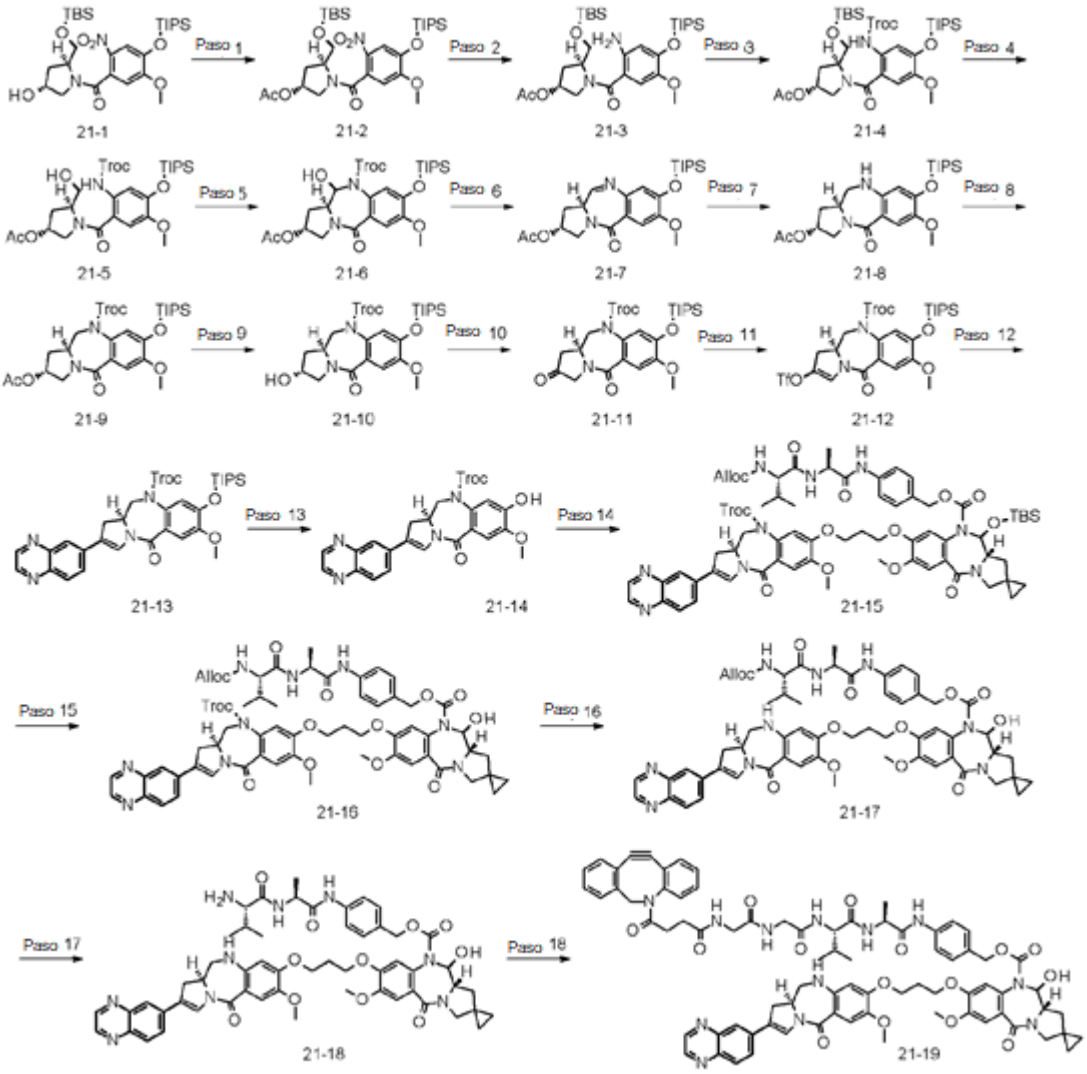
El compuesto obtenido en el paso 7 (0,0347 g, 0,0376 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,00770 g, 16 %).

MS (APCI, ESI)m/z:1323 $(M+H)^+$

[0489]

Ejemplo 21: Enlazador de fármaco 19

[Fórmula 145]




Paso 1: Compuesto 21-2

A una solución de materia prima de partida 21-1 (11,8 g, 20,2 mmol, WO 2013053872) y piridina (1,79 ml, 22,2 mmol) en THF (50 ml), se añadió lentamente anhídrido acético (2,10 ml, 22,3 mmol) con enfriamiento con hielo. Posteriormente, se añadió a la misma 4-dimetilaminopiridina (0,459 g, 3,76 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente.Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se filtró y luego se destiló a presión reducida, y se purificó el residuo resultante mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 60:40 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (12,3 g, 97 %).

MS(APCI, ESI)m/z:625$(M+H)^+$

[0490]

Paso 2: Compuesto 21-3

El compuesto obtenido en el paso 1 (12,3 g, 19,7 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 4 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (11,3 g, 97 %) MS(APCI, ESI)m/z:595$(M+H)^+$

[0491]

Paso 3: Compuesto 21-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (11,3 g, 19,0 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3, excepto que se usó cloroformiato de 2,2,2-tricloroetilo (2,93 ml, 21,9 mmol) en lugar de cloroformiato de alilo, para proporcionar el compuesto deseado (12,4 g, 85 %).

MS(APCI, ESI)m/z:769$(M+H)^+$

[0492]

Paso 4: Compuesto 21-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (12,4 g, 16,1 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (9,90 g, 94 %).

MS(APCI, ESI)m/z:655$(M+H)^+$

[0493]

Paso 5: Compuesto 21-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (9,90 g, 15,1 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (8,19 g, 83 %).

MS(APCI, ESI)m/z:653$(M+H)^+$

[0494]

Paso 6: Compuesto 21-7

Al compuesto obtenido en el paso 5 (3,00 g, 4,59 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) y a una solución acuosa de acetato de amonio al 10 % (10 ml), se añadió Cd/Pb al 10 % (3,00 g, 24,0 mmol, 90 % en masa), y el resultante se agitó vigorosamente bajo la atmósfera de nitrógeno. Después de que las materias primas desaparecieron, la mezcla de reacción se filtró. El filtrado se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se filtró, y luego se destiló a presión reducida, y el compuesto resultante (2,10 g, 99 %) se usó directamente para la reacción posterior.

MS(APCI, ESI)m/z:461$(M+H)^+$

[0495]

Paso 7: Compuesto 21-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (2,10 g, 4,56 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (2,09 g, 99 %).

MS(APCI, ESI)m/z:463$(M+H)^+$

[0496]

Paso 8: Compuesto 21-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (2,09 g, 4,52 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (2,88 g, 100 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,23(1H,s),6,81(1H,s),5,40-5,37(1H,m),4,95(1H,m),4,41(1H,m),4,21(1H,m),4,05(1H,m),3,96-3,92(1H,m),3,86(3H,s),3,79-3,75(1H,m),3,64(1H,m),2,34-2,28(1H,m),2,18-2,13(1H,m),2,05(3H,s),1,30-1,19(3H,m),1,11-1,04(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:637$(M+H)^+$

[0497]

Paso 9: Compuesto 21-10

A una solución mixta del compuesto obtenido en el paso 8 (2,28 g, 4,51 mmol) en metanol (15 ml) y tetrahidrofurano (5 ml), se añadió lentamente gota a gota una solución de carbonato de potasio (0,624 g, 4,52 mmol) en agua (15 ml), y el resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se filtró, y luego se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (2,08 g, 77 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,18(1H,s),6,80(1H,s),4,96(1H,m),4,64-4,59(1H,m),4,40(1H,m),4,18(1H,m),4,00-3,92(2H,m),3,82(3H,s),3,65(2H,m),2,28-2,20(2H,m),2,04-1,97(1H,m),1,27-1,20(3H,m),1,09-1,05(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:595$(M+H)^+$

[0498]

Paso 10: Compuesto 21-11

A una solución del compuesto obtenido en el paso 9 (2,08 g, 3,49 mmol) y a un radical de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiloxi (0,109 g, 0,698 mmol) en diclorometano (50 ml), se añadió lentamente diacetato de yodobenceno (2,00 g, 6,21 mmol) con enfriamiento con hielo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que las materias primas desaparecieron, se añadió agua a la mezcla de reacción y la mezcla

de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El resultante se filtró, y luego se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 60:40 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (1,94 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,21(1H,s),6,84(1H,s),4,96(1H,m),4,44(1H,m),4,34-4,23(3H,m),3,99-3,92(1H,m),3,86(3H,s),3,68-3,62(1H,m),2,94(1H,m),2,50-2,46(1H,m),1,29-1,21(3H,m),1,21-1,21(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:593$(M+H)^+$

[0499]

Paso 11: Compuesto 21-12

El compuesto obtenido en el paso 10 (1,94 g, 3,27 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (2,17 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,22-7,18(2H,m),6,84(1H,s),4,95(1H,m),4,45-4,39(2H,m),4,23-4,15(1H,m),3,85(3H,s),3,64(1H,m),3,36-3,30(1H,m),2,74-2,68(1H,m),1,29-1,19(3H,m),1,11-1,04(18H,m).

[0500]

Paso 12: Compuesto 21-13

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,837 g, 1,15 mmol) y el éster de pinacol de ácido quinoxalino-6-borónico (1,18 g, 4,61 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,713 g , 88 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,82-8,77(2H,m),8,05(1H,m),7,95(1H,m),7,79-7,75(2H,m),7,25(1H,s),6,88(1H,s),4,96(1H,m),4,49-4,40(2H,m),4,37-4,28(1H,m),3,88(3H,s),3,75(1H,m),3,48(1H,m),2,90(1H,m),1,30-1,22(3H,m),1,13-1,06(18H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:705$(M+H)^+$

[0501]

Paso 13: Compuesto 21-14

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,713 g, 1,01 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,400 g, 72 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,81-8,80(2H,m),8,05(1H,m),7,95(1H,m),7,80-7,75(2H,m),7,29(1H,s),6,96(1H,s),6,10(1H,m),5,07(1H,m),4,45-

4,32(3H,m),3,98(3H,s),3,80-3,73(1H,m),3,51-3,46(1H,m),2,91(1H,m). MS(APCI, ESI)m/z:549$(M+H)^+$

[0502]

Paso 14: Compuesto 21-15

Con el uso del compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,321 g, 0,346 mmol), el compuesto obtenido en el paso 13 (0,200 g, 0,364 mmol) se sometió a reacción de acoplamiento de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,475 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,83-8,79(2H,m),8,65-8,55(1H,m),8,09-7,98(2H,m),7,92-7,82(2H,m),7,47-7,31(2H,m),7,24-7,19(1H,m),7,14-7,02(2H,m),6,97-6,88(1H,m),6,80-6,66(1H,m),6,55-6,47(1H,m),6,06-6,00(1H,m),5,97-5,85(1H,m),5,51-5,09(3H,m),4,82-4,71(2H,m),4,63-4,52(2H,m),4,48-4,30(2H,m),4,26-4,17(2H,m),4,16-4,09(1H,m),4,08-3,98(3H,m),3,9-3,73(6H,m),3,53-3,44(2H,m),3,28-3,26(1H,m),2,94-2,91(1H,m),2,40-2,33(2H,m),2,21-2,13(1H,m),2,07-2,03(4H,m),1,67-1,50(2H,m),1,46-1,39(2H,m),1,29-1,24(2H,m),1,00-0,60(18H,m),0,22--0,06(6H,m). MS(APCI, ESI)m/z:1395$(M+H)^+$

[0503]

Paso 15: Compuesto 21-16

El compuesto obtenido en el paso 14 (0,475 g, 0,340 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,310 g, 71 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,83-8,79(2H,m),8,72(1H,m),8,07-8,01(2H,m),7,88(2H,m),7,41-7,39(2H,m),7,23(1H,m),7,13(2H,m),6,84(1H,m),6,56(1H,s),5,95-5,88(2H,m),5,48-5,47(1H,m),5,32-5,10(3H,m),4,87-4,72(2H,m),4,61-4,55(2H,m),4,47-4,20(3H,m),4,07-4,03(2H,m),3,90(3H,s),3,83(3H,s),3,80-3,72(3H,m),3,58(1H,m),3,49(1H,m),3,31(1H,m),2,92(1H,m),2,41(1H,m),2,36-2,29(1H,m),2,19-2,11(1H,m),1,77-1,72(1H,m),1,68-1,66(3H,m),1,65-1,63(1H,m),1,42-1,41(3H,m),0,97(3H,m),0,93(3H,m),0,76-0,61(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1282$(M+H)^+$

[0504]

Paso 16: Compuesto 21-17

El compuesto obtenido en el paso 15 (0,310 g, 0,242 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (0,168 g, 63 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,85-8,76(3H,m),8,04-7,99(3H,m),7,86(1H,s),7,49-7,41(3H,m),7,25-7,06(3H,m),6,96-6,83(1H,m),6,49(1H,m),6,13(1H,s),5,51-5,45(2H,m),5,34-

5,28(2H,m),5,21(1H,m),4,80-4,37(4H,m),4,17-4,02(6H,m),3,88(3H,s),3,84-3,70(6H,m),3,68-3,50(5H,m),3,31(1H,m),2,93-2,90(1H,m),2,42(1H,m),2,29-2,12(3H,m),1,78-1,75(1H,m),1,44(3H,m),0,97(3H,m),0,94(3H,m),0,79-0,60(4H,m).

MS(APCI, ESI)m/z:1108$(M+H)^+$

[0505]

Paso 17: Compuesto 21-18

El compuesto obtenido en el paso 16 (0,168 g, 0,152 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,112 g, 72 %).

$^1$H-RMN(CDCl3)δ: 9,18 (1H, m), 8,78 (2H, m), 8,04-8,02 (2H, m), 7,95-7,93 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,50-7,44 (3H, m), 7,23-7,21 (1H, m), 7,11 (2H, m), 6,44 (1H, m), 6,11 (1H, m), 5,90 (1H, m), 5,34 (1H, m), 4,74-4,63 (3H, m), 4,42 (1H, m), 4,16-4,03 (3H, m), 3,89 (3H, s), 3,80 (3H, s), 3,74-3,72 (1H, m), 3,65-3,51 (4H, m), 3,32-3,28 (3H, m), 2,92 (1H, m), 2,41 (1H, m), 2,34-2,28 (1H, m), 2,20-2,18 (2H, m), 1,76 (4H, m), 1,43 (3H, m), 1,00 (3H, m), 0,84 (3H, m), 0,75-0,62 (4H, m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1024 $(M + H)^+$

[0506]

Paso 18: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-5-oxo-2-(quinoxalina-6-il)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

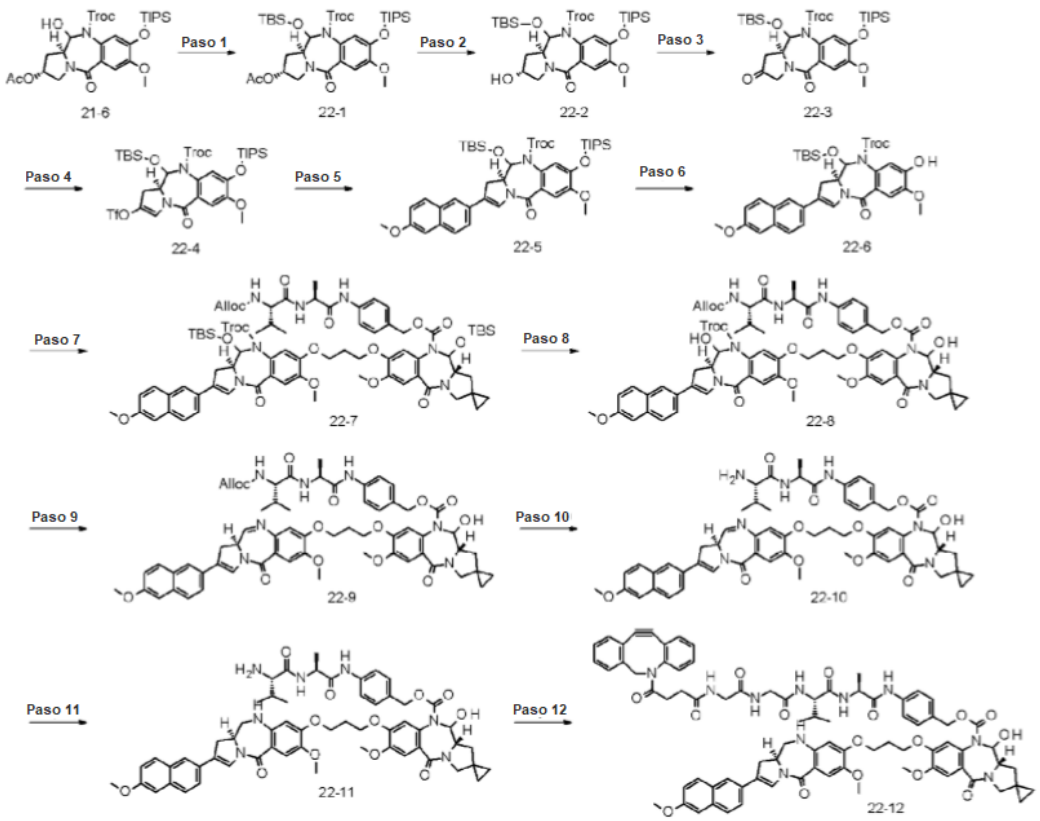
El compuesto obtenido en el paso 18 (0,112 g, 0,109 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,110 g, 71 %).

MS (APCI, ESI) m/z:1425 $(M + H)^+$

[0507]

Ejemplo 22: Enlazador de fármacos 20

[Fórmula 146]




---

Paso 1: Compuesto 22-1

El compuesto obtenido en el paso 5 del Ejemplo 21 (5,11 g, 7,81 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (5,70 g, 95,0 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 767 $(M + H)^+$

[0508]

Paso 2: Compuesto 22-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (5,70 g, 7,42 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (5,07 g, 94 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 725 $(M + H)^+$

[0509]

Paso 3: Compuesto 22-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (5,07 g, 6,98 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (4,44 g, 88 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 723 $(M + H)^+$

[0510]

Paso 4: Compuesto 22-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (4,44 g, 6,13 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (4,85 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7.24-7,16(1H,m),6,78(1H,s),5,92(1H,m),5,05(1H,m),4,34(1H,m),3,91-3,87(2H,m),3,86(3H,s),3,35-3,29(1H,m),2,80(1H,m),1,28-1,22(3H,m),1,10-1,05(18H,m),0,86(9H,s),0,28(3H,s),0,21(3H,s).

[0511]

Paso 5: Compuesto 22-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,20 g, 1,40 mmol) y ácido 6-metoxi-2-naftilborónico (0,850 g, 4,21 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,06 g, 88 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7.72-7,69(2H,m),7,59-7,51(3H,m),7,30(1H,s),7,16-7,07(2H,m),6,82(1H,s),5,94(1H,m),5,06(1H,m),4,34(1H,m),3,99-3,95(1H,m),3,93(3H,s),3,88(3H,s),3,46(1H,m),2,94(1H,m),1,30-1,23(3H,m),1,12-1,07(18H,m),0,93(9H,s),0,31(3H,s),0,23(3H,s).

[0512]

Paso 6: Compuesto 22-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (1,06 g, 1,23 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,6126 g, 71 %). MS (APCI, ESI) m/z: 707 $(M + H)^+$

[0513]

Paso 7: Compuesto 22-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,205 g, 0,290 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,255 g, 0,274 mmol) se sometieron a reacción de

acoplamiento de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,375 g, 83 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8.68(1H,s),7,72(2H,m),7,67-7,55(3H,m),7,36-7,21(4H,m),7,16-7,06(4H,m),6,82-6,79(2H,m),6,53(1H,s),6,03-6,02(1H,m),5,97-5,89(2H,m),5,36-5,30(2H,m),5,23-5,16(3H,m),4,83-4,80(1H,m),4,75-4,72(1H,m),4,61-4,55(3H,m),4,33-4,29(1H,m),4,17-4,11(2H,m),4,06-4,01(2H,m),3,94(3H,s),3,92-3,90(2H,m),3,81(3H,s),3,72-3,70(1H,m),3,51-3,47(2H,m),3,26(1H,m),2,99-2,95(1H,m),2,42-2,32(2H,m),2,20-2,13(1H,m),1,55-1,40(4H,m),0,97-0,92(18H,m),0,84-0,81(9H,m),0,69-0,63(4H,m),0,30-0,05(12H,m).

[0514]

Paso 8: Compuesto 22-8

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,375 g, 0,241 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,236 g, 74 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,70(1H,s),7,72-7,68(3H,m),7,63-7,58(2H,m),7,43-7,41(2H,m),7,27-7,22(2H,m),7,16-7,12(2H,m),6,91-6,86(2H,m),6,56(1H,s),5,95-5,84(2H,m),5,49(1H,m),5,34-5,14(4H,m),4,78(1H,m),4,64-4,53(4H,m),4,27-4,24(2H,m),4,17-4,02(3H,m),3,97-3,88(2H,m),3,93(3H,s),3,89(3H,s),3,88(3H,s),3,75-3,72(2H,m),3,61-3,48(3H,m),3,33-3,30(2H,m),3,23-3,19(1H,m),2,44-2,39(2H,m),2,29-2,27(2H,m),2,17-2,11(1H,m),1,76-1,72(1H,m),1,43(3H,m),0,95(3H,m),0,92(3H,m),0,77-0,61(4H,m).

[0515]

Paso 9: Compuesto 22-9

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,236 g, 0,178 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 21 para proporcionar el compuesto deseado (0,201 g, 99 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1134 $(M + H)^+$

[0516]

Paso 10: Compuesto 22-10

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,201 g, 0,177 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,180 g, 97 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,17(1H,s),7,90(1H,s),7,72-7,68(2H,m),7,63-7,53(4H,m),7,44-7,42(2H,m),7,25-7,22(1H,m),7,16-7,12(3H,m),7,02-6,99(2H,m),6,76-6,74(1H,m),6,59(1H,s),6,41(1H,s),5,94-5,87(2H,m),5,42(1H,m),4,66(1H,m),4,56-4,49(2H,m),4,40-4,38(1H,m),4,29-4,24(1H,m),4,17-4,11(1H,m),3,93(3H,s),3,89(3H,s),3,87(3H,s),3,85-3,70(2H,m),3,65-3,59(2H,m),3,37-3,31(2H,m),3,06(1H,m),2,46-2,41(2H,m),2,20(1H,m),2,10-2,06(1H,m),1,76-1,74(2H,m),1,17(3H,m),0,88-0,63(4H,m),0,78(3H,m),0,67(3H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1050 $(M + H)^+$

[0517]

Paso 11: Compuesto 22-11

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,0870 g, 0,0828 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0650 g, 75 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,19(1H,s),7,92(1H,m),7,73-7,64(4H,m),7,55-7,44(4H,m),7,22(1H,s),7,15-7,09(4H,m),6,43(1H,s),6,09(1H,s),5,90(2H,m),5,34(1H,m),4,72(1H,m),4,65-4,63(1H,m),4,36-4,34(1H,m),4,17-4,02(4H,m),3,92(3H,s),3,89(3H,s),3,80(3H,s),3,78-3,72(3H,m),3,60-3,46(5H,m),3,31-3,27(2H,m),2,89-2,85(1H,m),2,41(1H,m),2,33-2,26(1H,m),2,21-2,15(2H,m),1,77-1,75(1H,m),1,43(3H,m),0,98(3H,m),0,83(3H,m),0,76-0,61(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1051 $(M + H)^+$

[0518]

Paso 12: N-[4-(11,12-Didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(6-metoxinaftalen-2-il)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11 ', 11a'-dihidro-1'H-

espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10 '(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

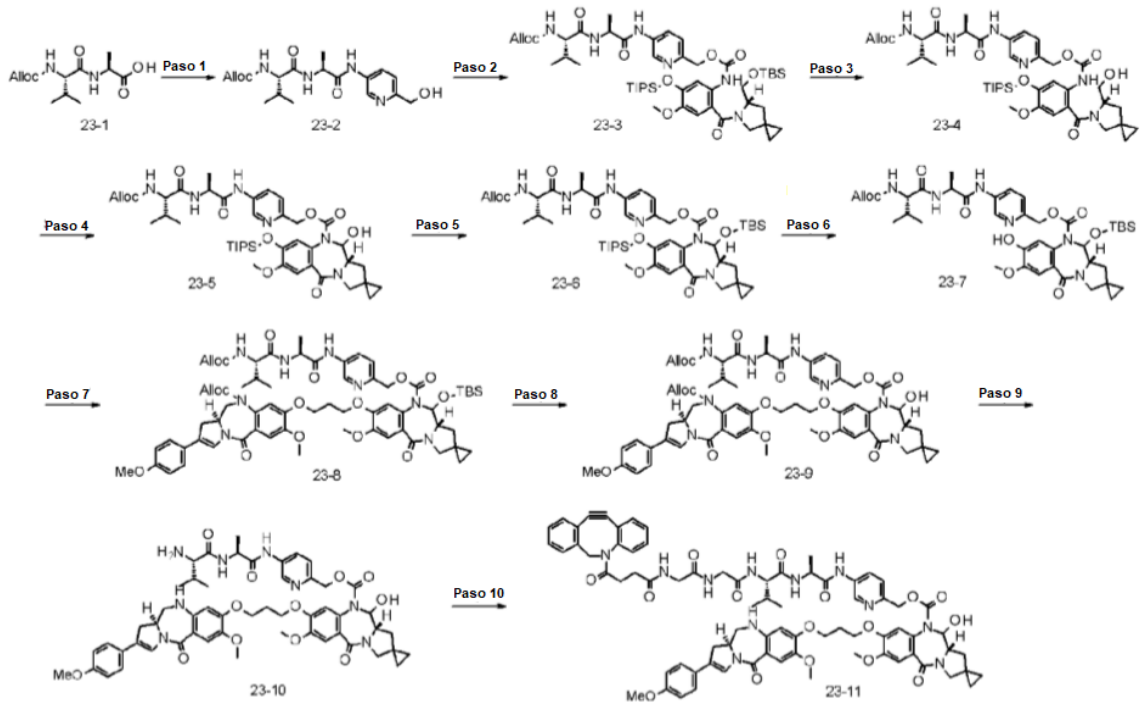
El compuesto obtenido en el paso 11 (0,065 g, 0,062 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,048 g, 54 %).

MS (APCI, ESI) m/z:1453 $(M + H)^+$

[0519]

Ejemplo 23: Enlazador de fármacos 21

[Fórmula 147]




Paso 1: Compuesto 23-2

La materia prima de partida 23-1 (14,8 g, 54,4 mmol, WO 2011130613) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 5 para proporcionar el compuesto deseado (12,2 g, 63 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 379 $(M + H)^+$

[0520]

Paso 2: Compuesto 23-3

El compuesto obtenido en el paso 1 (3,78 g, 10,0 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (3,86 g, 40 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 967 $(M + H)^+$

[0521]

Paso 3: Compuesto 23-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (3,860 g, 3,99 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (3,11 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,03(1H,m),8,70-8,63(2H,m),8,17-8,13(1H,m),7,68(1H,s),7,35(1H,m),6,82-6,76(2H,m),5,93-5,83(1H,m),5,49-5,42(1H,m),5,32-5,17(4H,m),4,73-4,52(5H,m),4,03(1H,m),3,86(1H,s),3,80-3,75(2H,m),3,77(3H,s),3,65-3,63(1H,m),3,12-3,10(1H,m),2,20-2,14(1H,m),1,93-1,88(1H,m),1,45(3H,m),1,31-1,23(3H,m),1,10-1,08(18H,m),0,98(3H,m),0,94(3H,m),0,64-0,47(4H,m).

[0522]

Paso 4: Compuesto 23-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (3,11 g, 3,65 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,58 g, 84 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,02-8,88(1H,m),8,69-8,59(1H,m),8,17-8,02(1H,m),7,22-7,17(1H,m),7,02(1H,m),6,79-6,78(2H,m),6,63(1H,m),5,95-5,87(2H,m),5,33-5,11(4H,m),4,65-4,53(3H,m),4,01(1H,m),3,83(3H,s),3,73(1H,m),3,59(1H,m),3,32(1H,m),2,43-2,39(1H,m),2,18-2,16(1H,m),1,75-1,67(2H,m),1,48-1,43(3H,m),1,20-1,14(3H,m),1,10-0,94(24H,m),0,73-0,60(4H,m).

[0523]

Paso 5: Compuesto 23-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (2,58 g, 3,03 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,75 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,78(1H,m),8,58(1H,m),8,03(1H,m),7,21(1H,s),6,97(1H,m),6,73(1H,s),6,59-6,55(1H,m),6,02(1H,m),5,93-5,85(1H,m),5,32-5,04(4H,m),4,72-

4,55(3H,m),3,99(1H,m),3,84(3H,s),3,73-3,70(1H,m),3,53(1H,m),3,28(1H,m),2,36(1H,m),2,21-2,14(1H,m),1,55-1,53(1H,m),1,47-1,44(4H,m),1,23-1,16(3H,m),1,10-1,00(18H,m),0,98(3H,m),0,94(3H,m),0,83(9H,s),0,81-0,60(4H,m),0,21-0,19(3H,m),0,18-0,16(3H,m).

[0524]

Paso 6: Compuesto 23-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (2,75 g, 2,85 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,28 g, 99 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 809 $(M + H)^+$

[0525]

Paso 7: Compuesto 23-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,340 g, 0,420 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,530 g, 98 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1285 $(M + H)^+$

[0526]

Paso 8: Compuesto 23-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,530 g, 0,412 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,362 g, 75 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1171 $(M + H)^+$

[0527]

Paso 9: Compuesto 23-10

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,444 g, 0,379 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,347 g, 91 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1103 $(M + H)^+$

[0528]

Paso 10: N- [4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{6-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] piridina-3-il}-L-alaninamida

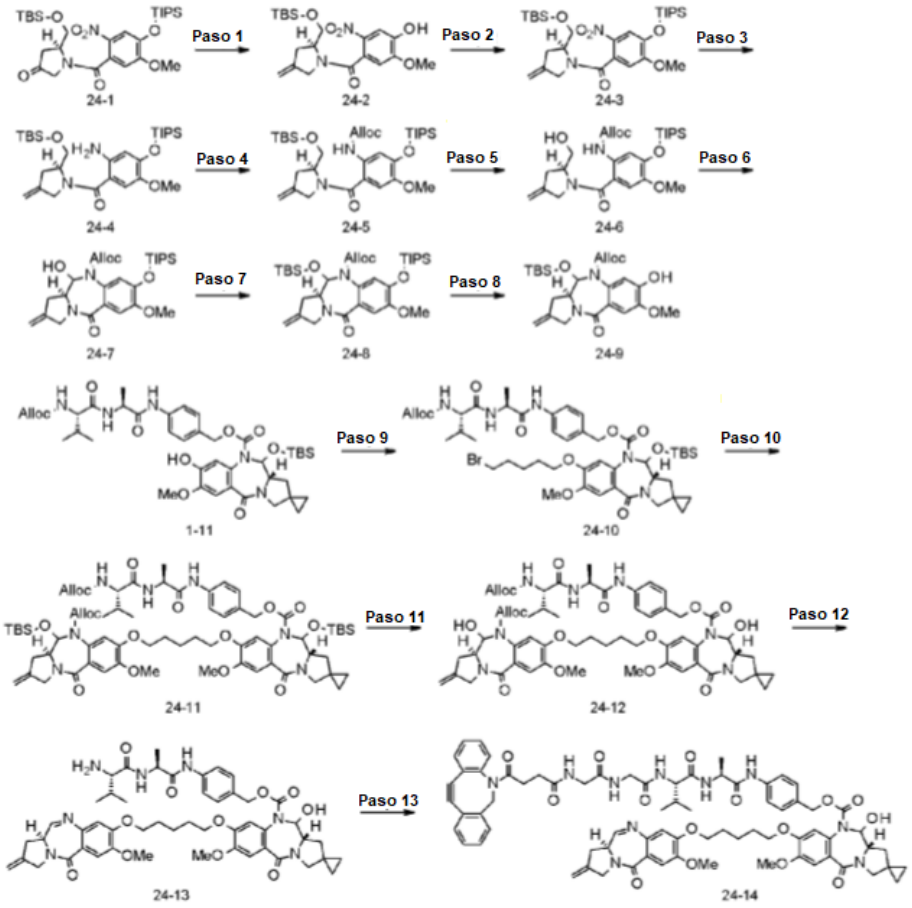
El compuesto obtenido en el paso 9 (0,100 g, 0,0997 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,067 g, 48 %).

MS (APCI, ESI) m/z:1404 $(M + H)^+$

[0529]

Ejemplo 24: enlazador de fármacos 22

[Fórmula 148]




Paso 1: Compuesto 24-2

A una solución en suspensión de bromuro de metiltrifenilfosfonio (7,28g, 20,4 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL), se añadió terc-butóxido de potasio (2,06 g, 18,3 mmol) en pequeñas porciones en la atmosfera de nitrógeno a 0 °C, y el resultado se agitó durante 2 horas. Se añadió una solución del compuesto 24-1 (1,18 g, 2,04 mmol, WO 2013053872) gota a gota en THF (10 ml) durante 2 minutos, y el resultante se agitó a 0 °C durante 28 horas. Se añadió agua y una solución acuosa de ácido cítrico a la solución de reacción (pH = 4,0), que luego se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio.

El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,450 g, 52 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 423 $(M+ H)^+$.

[0530]

Paso 2: Compuesto 24-3

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (0,668 g, 1,58 mmol) en N,N-dimetilformamida (10 ml), se añadió imidazol (0,211 g, 3,16 mmol) en la atmósfera de nitrógeno. Luego se añadió cloruro de triisopropilsililo (0,502 ml, 2,37 mmol) gota a gota, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. A la solución de reacción, se le añadió una solución acuosa al 10 % de ácido cítrico, que se extrajo dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,520 g, 57 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 579$(M + H)^+$.

[0531]

Paso 3: Compuesto 24-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,520 g, 0,898 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 17 para proporcionar el compuesto deseado (0,478 g, 97 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 547$(M - H)^+$.

[0532]

Paso 4: Compuesto 24-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,478 g, 0,871 mmol), bajo la atmósfera de nitrógeno, se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3. Después de la destilación a presión reducida, el residuo resultante (0,570 g) se usó directamente para la reacción posterior.

[0533]

Paso 5: Compuesto 24-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,570 g) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,446 g, 95 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 519 $(M+ H)^+$.

[0534]

Paso 6: Compuesto 24-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,446 g, 0,859 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,196 g, 44 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,19(1H,s),6,68(1H,s),5,78-5,76(1H,m),5,55(1H,m),5,19-5,13(4H,m),4,61-4,58(1H,m),4,49-4,46(1H,m),4,29(1H,m),4,15(1H,m),3,85(3H,s),3,61(1H,m),3,38(1H,s),2,93-2,90(1H,m),2,71(1H,m),1,30-1,18(3H,m),1,12-1,06(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 517 $(M + H)^+$.

[0535]

Paso 7: Compuesto 24-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,195 g, 0,377 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,230 g, 97 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,19(1H,s),6,66(1H,s),5,75-5,65(1H,m),5,66(1H,m),5,12-5,10(4H,m),4,59(1H,m),4,35(1H,m),4,28(1H,m),4,11(1H,m),3,86(3H,s),3,53(1H,m),2,9

0-2,84(1H,m),2,48(1H,m),1,26-1,19(3H,m),1,09-1,06(18H,m),0,86(9H,s),0,23(3H,s),0,17(3H,s).

[0536]

Paso 8: Compuesto 24-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,230 g, 0,365 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1. En este paso se llevó a cabo una operación de separación de líquidos después de la terminación de la reacción, y un producto crudo (0,238 g, cuantitativo) obtenido al destilar el solvente orgánico a presión reducida se utilizó para la reacción posterior.

[0537]

Paso 9: Compuesto 24-10

El compuesto obtenido en el paso anterior y el compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 1 (0,251 g, 0,311 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,185 g, 62 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 958[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 956 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0538]

Paso 10: Compuesto 24-11

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,0660 g, 0,139 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 9 (0,133 g, 0,139 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,123 g, 66 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1350 $(M + H)^+$.

[0539]

Paso 11: Compuesto 24-12

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,123 g, 0,0910 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0950 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,65(1H,s),7,59(2H,m),7,31-7,29(2H,m),7,23-7,21(3H,m),6,89-6,86(1H,m),6,78(1H,s),6,8(1H,s),5,92-5,88(2H,m),5,81-5,79(1H,m),5,61-

5,52(2H,m),5,31(2H,m),5,23(1H,n),5,13-5,10(4H,m),5,05-5,02(1H,m),4,69-4,67(2H,m),4,58-4,55(2H,m),4,49-4,46(1H,m),4,30(2H,m),4,16(1H,m),3,98-3,96(3H,m),3,93(3H,s),3,89(3H,s),3,81-3,78(2H,m),3,74(1H,m),3,69-3,66(1H,m),3,61(1H,m),3,43-3,41(1H,m),3,32(1H,m),2,89-2,87(1H,m),2,73(1H,m),2,42(1H,m),2,10-2,08(1H,m),1,80-1,73(4H,m),1,53-1,50(2H,m),1,25-1,24(3H,m),0,93-0,89(6H,m),0,75-0,63(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1122 $(M + H)^+$

[0540]

Paso 12: Compuesto 24-13

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,0950 g, 0,0847 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0610 g, 76 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,12-8,96(1H,m),7,82-7,60(4H,m),7,22-7,19(3H,m),6,94-6,66(1H,m),6,40-6,34(2H,m),5,89-5,86(1H,m),5,55(1H,m),5,40-5,07(3H,m),4,60-4,42(4H,m),4,23-4,09(5H,m),3,91-3,88(8H,m),3,81-3,75(8H,m),3,60(1H,m),3,32-3,30(2H,m),3,24-3,22(1H,m),3,12-3,09(1H,m),2,65-2,61(1H,m),2,41(1H,m),2,12-2,11(1H,m),1,89-1,84(9H,m),1,75(3H,m),1,40-1,38(2H,m),1,25-1,21(3H,m),0,99(3H,m),0,84(3H,m),0,74-0,66(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 936 $(M + H)^+$.

[0541]

Paso 13: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b, f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11aS)-7-metoxi-2-metilideno-5-oxo-2,3,5,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina-8-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,0600 g, 0,0629 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,075 g, 89 %).

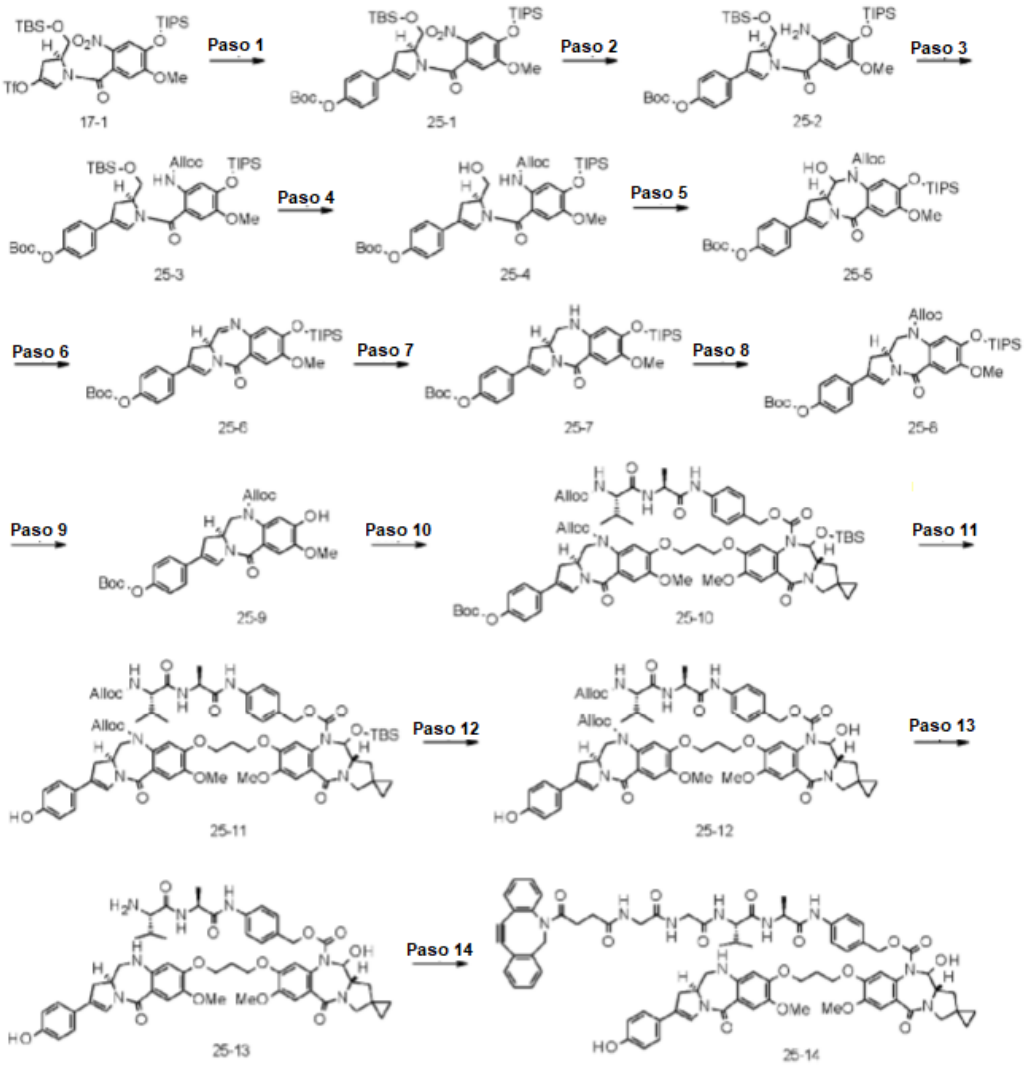
$^{1}$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,91(1H,s),8,21-8,16(2H,m),8,07-8,03(1H,m),7,74-7,65(3H,m),7,60-7,44(6H,m),7,39-7,29(5H,m),7,21-7,19(2H,m),7,03(1H,s),6,85(1H,s),6,72(1H,s),6,58-6,56(1H,m),5,77-5,74(1H,m),5,19-5,16(3H,m),5,03-5,00(1H,m),4,82-4,79(1H,m),4,36-4,33(1H,m),4,21-4,19(1H,m),4,14-4,11(2H,m),4,00-3,95(3H,m),3,80-3,73(10H,m),3,65-3,52(4H,m),3,41-3,38(2H,m),3,15-3,30(1H,m),3,14(1H,m),3,04-3,01(1H,m),2,68-2,66(1H,m),2,32-2,28(2H,m),2,05-1,98(2H,m),1,78-1,77(5H,m),1,57-1,54(3H,m),1,28-1,25(3H,m),0,86-0,81(6H,m),0,67-0,62(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1337 $(M + H)^{+}$.

[0542]

Ejemplo 25: Enlazador de fármacos 23

[Fórmula 149]




Paso 1: Compuesto 25-1

El material de partida 17-1 (3,81 g, 5,34 mmol) y el terc-butil 4- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaboran-2-il) fenilcarbonato (5,13 g, 16,0 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,05 g, 75 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 757 $(M + H)^+$.

[0543]

Paso 2: Compuesto 25-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (3,05 g, 4,09 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 17 para proporcionar el compuesto deseado (2,67 g, 91 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 727 $(M + H)^+$.

[0544]

Paso 3: Compuesto 25-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (2,67 g, 3,67 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3. En este paso se llevó a cabo una operación de separación de líquidos después de la terminación de la reacción, y un producto crudo (3,00 g, cuantitativo) obtenido al concentrar el solvente orgánico a presión reducida se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0545]

Paso 4: Compuesto 25-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (3,05 g) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,67 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,34(1H,m),7,70(1H,m),7,24(2H,m),7,12(2H,m),6,86(1H,s),6,84(1H,s),5,95-5,89(1H,m),5,31(1H,m),5,21(1H,m),4,87-4,86(1H,m),4,61-4,61(2H,m),4,41(1H,m),3,93-3.,0(2H,m),3,76(3H,s),3,29(1H,m),2,68-2,66(1H,m),1,55(9H,s),1,33-1,26(3H,m), 1,13-1,11(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 697 $(M + H)^+$

[0546]

Paso 5: Compuesto 25-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,22 g, 1,75 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (0,838 g, 69 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,45(1H,s),7,37(2H,m),7,22(1H,s),7,15(2H,m),7,11-7,09(1H,m),6,72(1H,s),5,82-5,79(1H,m),5,19-5,16(2H,m),4,61-4,59(2H,m),4,50-4,47(1H,m),4,00(1H,m),3,86(3H,s),3,41-3,28(1H,m),3,09-3,05(1H,m),1,57(9H,s),1,29-1,25(3H,m),1,14-1,07(18H,m). MS(APCI, ESI) m/z: 695 $(M + H)^+$ [0547]

Paso 6: Compuesto 25-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,838 g, 1,21 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,745 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,88(1H,m),7,50(1H,s),7,48-7,48(1H,m),7,40(2H,m),7,18(2H,m),6,86(1H,s),4,45-4,43(1H,m),3,90(3H,s),3,60-3,56(1H,m),3,38(1H,m),1,57(9H,s),1,31-1,26(3H,m),1,11-1,10(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 593 $(M + H)^+$.

[0548]

Pasos 7 al 9: Compuesto 25-9

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,745 g, 1,26 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 8 y 9 del Ejemplo 3 y que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,516 g, se dan en tres pasos: 78 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,46(1H,s),7,35(2H,m),7,27-7,25(2H,m),7,15(2H,m),6,82(1H,s),5,93(1H,s),5,84-5,81(1H,m),5,12(1H,m),4,61(1H,m),4,49-4,46(1H,m),4,35-4,32(1H,m),4,23-4,21(1H,m),3,96(3H,s),3,65-3,62(1H,m),3,29(1H,m),2,71(1H,m),1,57(9H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 523 $(M + H)^+$.

[0549]

Paso 10: Compuesto 25-10

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,105 g, 0,200 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,186 g, 0,200 mmol) se sometieron a reacción de acoplamiento de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el deseado compuesto (0.248 g, 90 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,72-8,50(1H,m),7,52(1H,s),7,40-7,38(4H,m),7,23-7,21(2H,m),7,16(2H,m),7,09(1H,m),6,84-6,82(2H,m),6,51-6,49(1H,m),6,02(1H,m),5,92-5,90(1H,m),5,30-5,21(5H,m),4,71-4,61(6H,m),4,36-4,24(5H,m),4,02-4,00(3H,m),3,93-3,88(1H,m)3,87(3H,s),3,81(3H,s),3,71(2H,m),3,51-3,49(1H,m),3,32-3,28(2H,m),2,72(1H,m),2,37-2,34(3H,m),2,16-

2,13(1H,m),1,66(9H,s),1,50-1,46(4H,m),0,97-0,93(7H,m),0,82(9H,s),0,68-0,65(4H,m),0,20(3H,s),0,14(3H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 1370 $(M + H)^+$

[0550]

Paso 11: Compuesto 25-11

A una solución del compuesto obtenido en el paso 10 (0.248 g, 0.181 mmol) en diclorometano (3 ml), se añadió piperidina (3 ml), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó con una solución acuosa de ácido cítrico y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, el solvente orgánico se removió por destilación a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,153 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,77-8,69(1H,m),7,40-7,36(3H,m),7,23-7,21(4H,m),7,07(2H,m),6,88-6,86(1H,m),6,82(2H,m),6,51(1H,s),6,03(1H,m),5,92-5,90(1H,m),5,30-5,21(4H,m),4,75-4,72(2H,m),4,58-4,55(3H,m),4,37-4,35(1H,m),4,23-4,21(3H,m),4,01-3,99(2H,m),3,86(3H,s),3,79(3H,s),3,72(2H,m),3,66-3,64(1H,m),3,51-3,48(1H,m),3,28(2H,m),2,67(1H,m),2,37-2,12(4H,m),1,55-1,52(2H,m),1,45-1,42(4H,m),0,95-0,91(6H,m),0,81(9H,s),0,81-0,78(2H,m),0,68-0,65(3H,m),0,20-0,15(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1270 $(M + H)^+$

[0551]

Paso 12: Compuesto 25-12

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,175 g, 0,138 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,162 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI) m/z: 1156 $(M + H)^+$

[0552]

Paso 13: Compuesto 25-13

El compuesto obtenido en el paso 12 (0,116 g, 0,100 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0410 g, 41 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 988 $(M + H)^+$

[0553]

Paso 14: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-8'-(3-{[(11aS)-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 13 (0,00500 g, 0,00506 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 2 del Ejemplo 2 (0,0100 g, 0,0202 mmol) se disolvieron en diclorometano (0,3 ml) y metanol (0,3 ml), y a esto se le añadió N,N-diisopropiletilamina (3,5 μL, 0,0202 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de reacción se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA

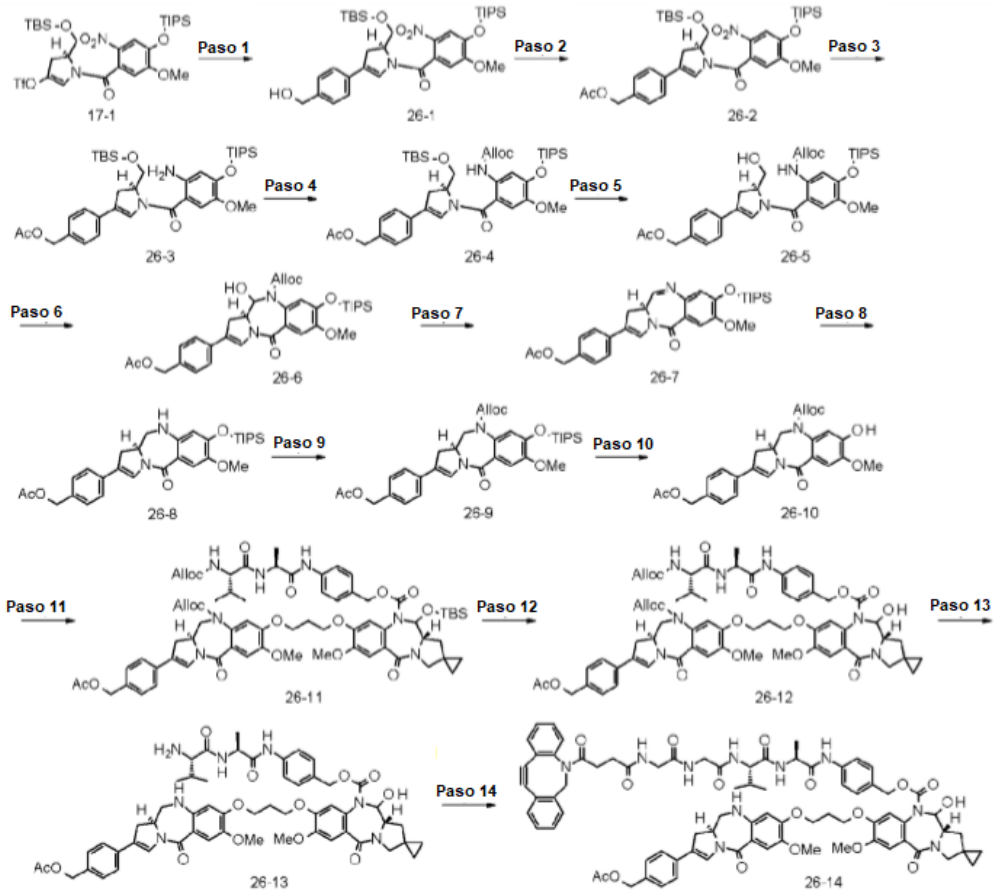
= 100: 0 (v/v) a 0: 100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,00350 g, 50 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1389 $(M + H)^+$

[0554]

Ejemplo 26: Enlazador de fármacos 24

[Fórmula 150]




Paso 1: Compuesto 26-1

El material de partida 17-1 (3,93 g, 5,51 mmol) y ácido 4-(hidroximetil) fenilborónico se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,09 g, 84 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 671 $(M + H)^+$

[0555]

Paso 2: Compuesto 26-2

Una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (3,09 g, 4,61 mmol) en diclorometano (100 ml) se enfrió con hielo, a la que se añadió trietilamina (1,60 ml, 11,5 mmol), y luego se añadió cloruro de acetilo (0,491 ml, 6,91 mmol) gota a gota a la misma, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de reacción se diluyó con una solución acuosa de ácido cítrico y se extrajo tres veces

con cloroformo. La capa orgánica se lavó con un carbonato de sodio acuoso y saturado y con salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el solvente se removió por destilación a presión reducida. El compuesto resultante (3,75 g, cuantitativo) se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0556]

Paso 3: Compuesto 26-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (3,28 g, 4,60 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 17 para proporcionar el compuesto deseado (2,09 g, 67 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 682 $(M + H)^+$

[0557]

Paso 4: Compuesto 26-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,01 g, 1,48 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3. El compuesto resultante a presión reducida, y el compuesto resultante (1,19 g, cuantitativo) se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0558]

Paso 5: Compuesto 26-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,19 g, 1,55 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,885 g, 87 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,34(1H,m),7,71(1H,s),7,31(2H,m),7,24(2H,m),6,91(1H,s),6,84(1H,s),5,97-5,88(1H,m),5,35-5,29(1H,m),5,22-5,20(1H,m),5,07(2H,s),4,88-4,87(1H,m),4,62-4,61(3H,m),4,33-4,31(1H,m),3,94-3,91(2H,m),3,76(3H,s),3,33-3,29(1H,m),2,68(1H,m),1,33-1,29(4H,m),1,15-1,12(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 653 $(M + H)^+$

[0559]

Los pasos 6 y 7: Compuesto 26-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,885 g, 1,36 mmol) se trató de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 9 y que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,515 g, 85 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 549 $(M + H)^+$ [0560]

Paso 8-10: Compuesto 26-10

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,515 g, 0,983 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 8 y 9 del Ejemplo 3 y que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,448 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,51(1H,s),7,37-7,30(4H,m),7,26-7,25(1H,m),6,82(1H,s),5,94(1H,s),5,86-5,79(1H,m),5,15-5,13(1H,m),5,09(3H,s),4,61(1H,m),4,48-4,46(1H,m),4,35-4,32(1H,m),4,25-4,23(1H,m),3,96(3H,s),3,64(1H,d,m),3,33-3,29(1H,m),2,73(1H,m),2,11(3H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 479 $(M + H)^+$

[0561]

Paso 11: Compuesto 26-11

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,0690 g, 0,144 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 1 (0,134 g, 0,144 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,118 g, 62 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1325 $(M + H)^+$.

[0562]

Los pasos 12 y 13: Compuesto 26-13

El compuesto obtenido en el paso 11 (0,134 g, 0,101 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 11 y 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0950 g, se dan en dos pasos:  90 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,14(1H,s),7,91(1H,m),7,69(1H,s),7,47(4H,m),7,40-7,38(2H,m),7,34-7,32(2H,m),7,21(1H,s),7,18(2H,m),7,13(2H,m),6,40(1H,s),6,08(1H,s),5,88(1H,m),5,36(

1H,m),5,09(2H,s),4,72(1H,m),4,62-4,59(2H,m),4,35-4,32(1H,m),4,12-4,07(4H,m),3,89(3H,s),3,80(3H,s),3,74-3,71(2H,m),3,58-3,53(3H,m),3,41-3,38(1H,m),3,31-3,29(2H,m),2,78-2,74(1H,m),2,41(1H,m),2,31-2,31(1H,m),2,18-2,15(1H,m),2,11(3H,s),1,76(1H,m),1,44-1,42(3H,m),0,99(3H,m),0,83(3H,m),0,71-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1044 $(M + H)^+$

[0563]

Paso 14: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-8'-(3 - {[(11aS)-2-{4-[(acetiloxi)metil]fenil} -7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-8-il] oxi}propoxi)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano- 1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

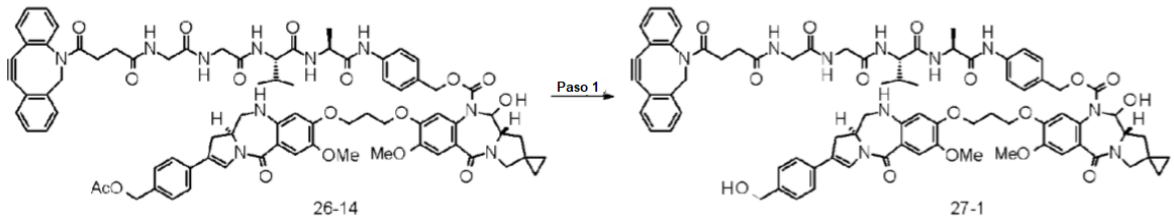
El compuesto obtenido en el paso 13 (0,0700 g, 0,0670 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0520 g, 54 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1445 $(M + H)^+$

[0564]

Ejemplo 27: Enlazador de fármacos 25

[Fórmula 151]




26-14 27-1

Paso 1: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-8'-[3-({(11aS)-2-[4-(hidroximetil) fenil]-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-

espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 26 (0,0230 g, 0,0159 mmol) en metanol (2 ml), se añadió solución de hidróxido de sodio 1 N (0,0175 ml, 0,0175 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente. durante 1 hora.

A esto, adicionalmente se añadió solución de hidróxido de sodio 1 N (0,0175 ml, 0,0175 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

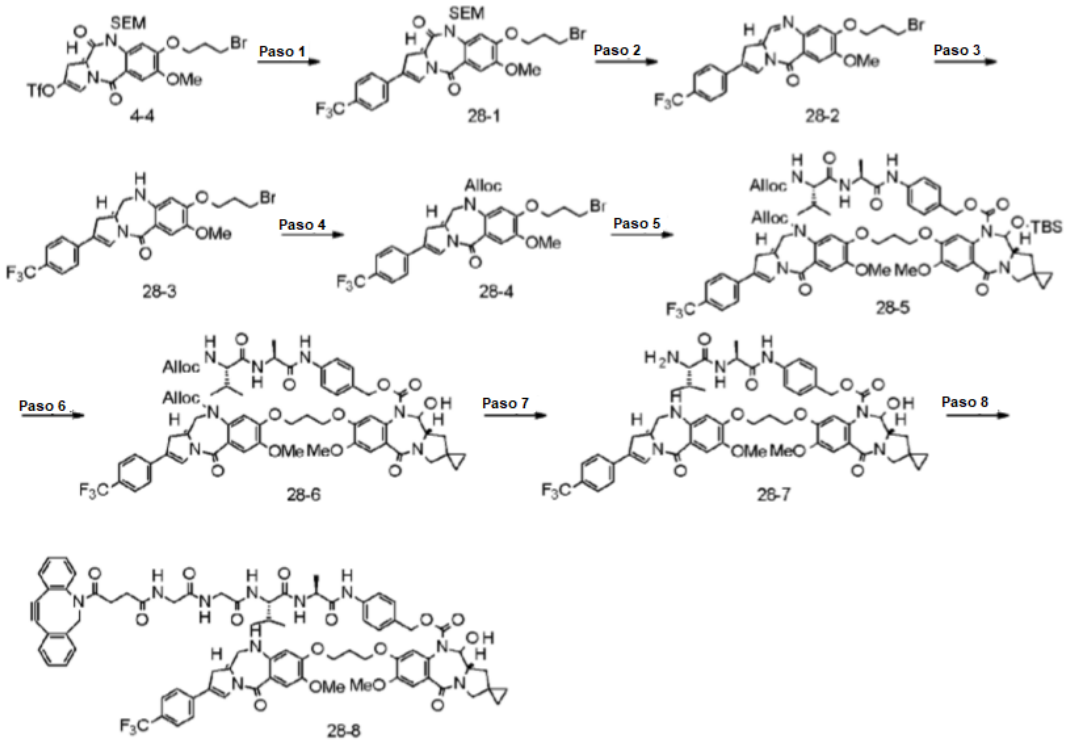
A la solución de reacción, se añadieron una solución acuosa de ácido clorhídrico 1 N (0,0350 ml) y agua, y el resultante se extrajo tres veces con cloroformo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó luego por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,0190 g, 85 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1403 $(M + H)^+$

[0565]

Ejemplo 28: Enlazador de fármacos 26

[Fórmula 152]



Paso 1: Compuesto 28-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,12 g, 1,70 mmol) y 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaboran-2-il) trifluorometilbenceno (0,924 g, 3,40 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,918 g, 83 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 657[$_{81}$Br,(M + H)$^+$], 655 [$_{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0566]

Paso 2: Compuesto 28-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,918 g, 1,40 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,425 g, 60 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 511[$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 509 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0567]

Paso 3: Compuesto 28-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,425 g, 0,834 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3. Después de una operación de separación de líquidos, el resultante a presión reducida, y el compuesto resultante (0,410 g) se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0568]

Paso 4: Compuesto 28-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,425 g, 0,834 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 y que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,420 g, 85 %). MS(APCI, ESI)m/z:597[$^{81}$Br,(M + H)$^+$],595[$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0569]

Paso 5: Compuesto 28-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,0960 g, 0,160 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,212 g, 99 %). MS(APCI, ESI) m/z: 1321 (M + H)$^+$

[0570]

Paso 6: Compuesto 28-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,210 g, 0,159 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,162 g, 84 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1208 $(M + H)^+$

[0571]

Paso 7: Compuesto 28-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,160 g, 0,132 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,103 g, 75 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1039 $(M + H)^+$

[0572]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehydrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-5-oxo-2-[4-(trifluorometil)fenil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepin-8-il}oxi) propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2 '-pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-alaninamida

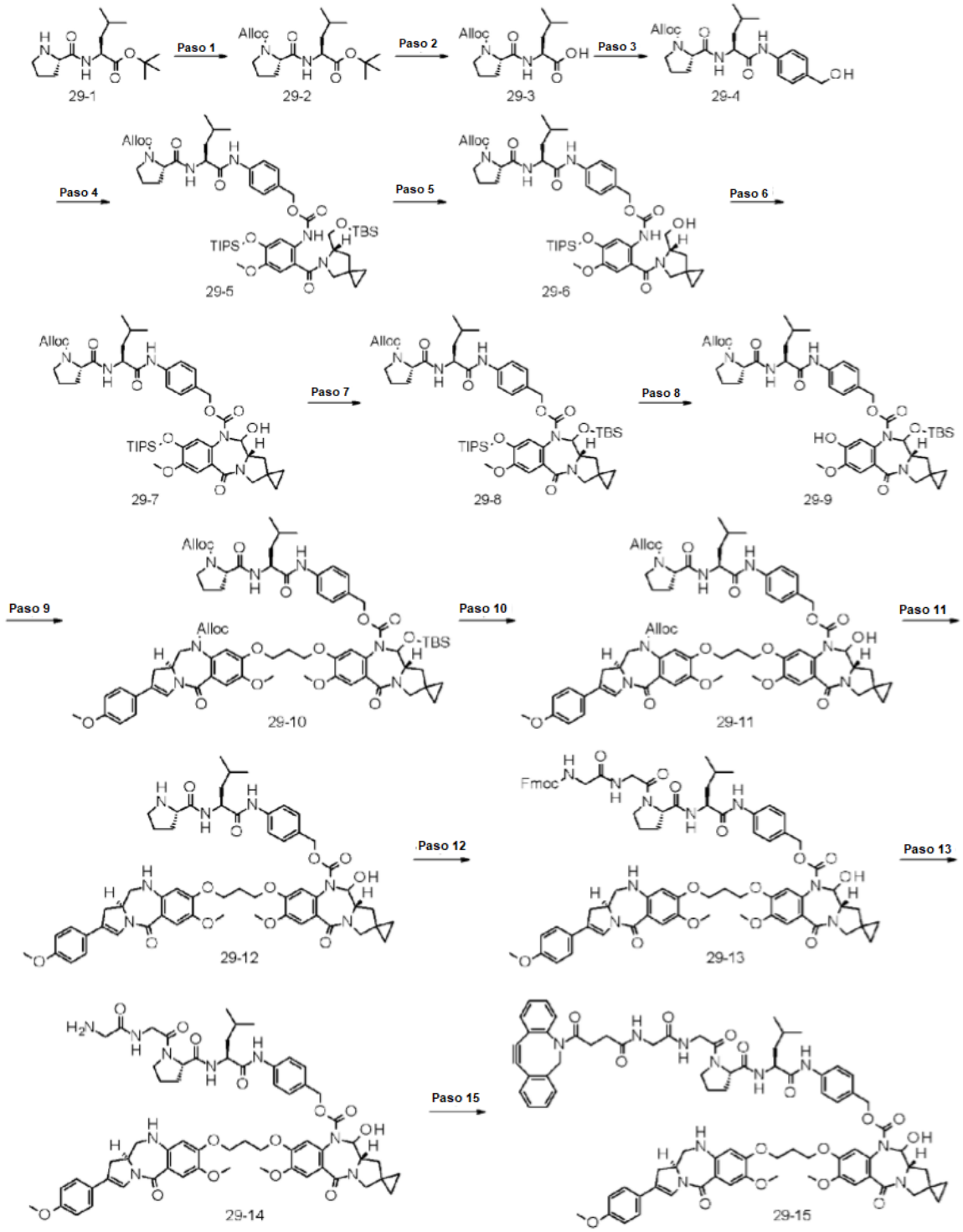
La materia prima de partida 4-4 y el compuesto obtenido en el paso 7 (0,101 g, 0,0971 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,107 g, 76 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1441 $(M + H)^+$

[0573]

Ejemplo 29: Enlazador de fármacos 27

[Fórmula 153]




Paso 1: se hizo reaccionar terc-butil 1-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-propil-L-leucinato terc-butil-L-propil-leucinato (4,64 g, 16,3 mmol) de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3, excepto que se usó trietilamina (3,41 mL, 24,5 mmol) en lugar de piridina. Después de la terminación de la reacción, se realizó una operación de separación de líquidos, y el solvente orgánico se removió por destilación a presión reducida,

y el compuesto resultante (5,79 g, 96 %) se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0574]

Paso 2: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-L-leucina

a una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (5,79 g, 15,7 mmol) en diclorometano (60 ml), ácido trifluoroacético (20 ml) se añadió, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó tolueno a las solución de reacción, la cual se destilo a presión reducida, y el compuesto resultante (2,69 g, 5 %) se utilizó directamente para la reacción posterior.

[0575]

Paso 3: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-prolil-N-[4-(hidroximetil)fenil]-L-leucinamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 2 (6,10 g, 19,5 mmol) en THF (100 mL), se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (5,07 g, 20,5 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A esto, se añadió alcohol 4-aminobencílico (2,16 g, 20,5 mmol) y el resultante se agitó durante la noche. La solución de reacción se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en acetato de etilo. El resultante se lavó con ácido clorhídrico diluido, un hidrogeno carbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el disolvente se removió por destilación a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano: acetato de etilo = 90:10 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (1,60 g, 20 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,62-8,33(1H,m),7,68-7,49(2H,m),7,31-7,30(2H,m),6,66-6,43(1H,m),5,97-5,70(1H,m),5,39-4,96(2H,m),4,64-4,53(5H,m),4,40-4,35(1H,m),3,57-3,50(2H,m),2,20-2,19(2H,m),1,98-1,97(3H,m),1,66-1,64(3H,m),0,97-0,94(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 418 $(M + H)^+$

[0576]

Paso 4: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-prolil-N-[4-({[(2-{[(6S)-6 -({[terc-butil (dimetil)sililo)] oxi}metil)-5-azaspiro [2,4]hept-5-il]carbonil}-4-metoxi-5 -{[tri (propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamoil]oxi}metil) fenil]-L-leucinamida.

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,838 g, 2,01 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,535 g, 37 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,98(1H,m),8,62(1H,s),7,80(1H,s),7,65-7,50(2H,m),7,33-7,31(2H,m),6,76(1H,s),6,67-6,34(1H,m),5,95-5,92(1H,m),5,33-5,25(1H,m),5,30-5,27(1H,m),5,12(2H,s),4,66-4,63(3H,m),4,58-4,55(3H,m),4,38-4,36(1H,m),3,99-3,96(1H,m),3,73(3H,s),3,70-3,65(2H,m),3,57-3,55(2H,m),3,04-3,02(1H,m),2,21-2,20(3H,m),1,98-1,95(3H,m),1,74-1,62(3H,m),1,32-1,30(3H,m),1,11-1,09(16H,m),0,97-0,94(6H,m),0,90(9H,s),0,60-0,52(4H,m),0,05-0,04(6H,m).

[0577]

Los pasos 5 y 6: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-L-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propano-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,535 g, 0,531 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 y que en el paso 3 del Ejemplo 9 para proporcionar el compuesto deseado (0,367 g, 78 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,60(1H,s),7,58-7,42(2H,m),7,19-7,16(3H,m),6,69-6,64(2H,m),5,89-5,87(2H,m),5,32-5,24(2H,m),5,10(1H,m),4,93(1H,m),4,65-4,63(1H,m),4,57-4,54(2H,m),4,37-4,34(1H,m),3,84(3H,s),3,72(1H,m),3,57-3,55(3H,m),3,40-3,38(1H,m),3,31(1H,m),2,41(1H,m),2,20-2,18(2H,m),1,98-1,95(3H,m),1,73(1H,m),1,66-1,63(1H,m),1,16-1,10(4H,m),1,05-0,99(18H,m)0,97-0,93(6H,m),0,71-0,64(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 890 $(M + H)^+$

[0578]

Paso 7: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propano-2-il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,367 g, 0,412 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,181 g, 44 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,54(1H,s),7,52-7,45(2H,m),7,19(1H,s),7,14(2H,m),6,71-6,68(1H,m),6,61(1H,s),6,01(1H,m),5,94-5,92(1H,m),5,34-5,17(2H,m),4,77(1H,m),4,64-4,56(3H,m),4,38-4,35(1H,m),3,85(3H,s),3,72-3,69(1H,m),3,55-3,46(3H,m),3,27(1H,m),2,35(1H,m),2,21-2,18(2H,m),1,97-1,95(3H,m),1,54-1,51(2H,m),1,16-1,09(5H,m),1,02-1,01(18H,m),0,97-0,93(6H,m),0,81(9H,s),0,68-0,63(4H,m),0,19(3H,s),0,09(3H,s).

[0579]

Paso 8: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil (dimetil) silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,181 g, 0,180 mmol) se trató de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,153 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,57-8,27(1H,m),7,69-7,41(2H,m),7,23(1H,s),7,12(2H,m),6,69-6,66(1H,m),6,64(1H,s),5,99-5,92(3H,m),5,34-5,19(3H,m),4,81(1H,m),4,63-4,57(4H,m),4,38-4,36(1H,m),3,94(3H,s),3,71(1H,m),3,54-3,52(3H,m),3,27(1H,m),2,35(1H,m),2,19(2H,m),1,97-1,95(3H,m),1,55-1.52(2H,m),0.97-0.93(6H,m),0.81(9H,s),0.76-0.61(4H,m),0.21(3H,s),0.09(3H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 848 (M + H)+

[0580]

Paso 9: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil) silil]oxi}-7'-metoxi-8 '-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonilo]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-8-il} oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,153 g, 0,180 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,137 g, 57 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,79(1H,s),7,54-7,51(1H,m),7,39-7,37(2H,m),7,30-7,29(2H,m),7,23-7,21(3H,m),7,13-7,11(2H,m),6,88(2H,m),6,82-6,80(1H,m),6,50-6,48(1H,m),6,03-6,01(1H,m),5,92-5,89(1H,m),5,75-5,72(1H,m),5,28-5,26(3H,m),5,06-5,03(2H,m),4,74-4,71(1H,m),4,62-4,60(4H,m),4,36-4,34(2H,m),4,22-4,19(3H,m),4,01-3,99(1H,m),3,88(3H,s),3,84-3,81(6H,m),3,71(2H,m),3,53-3,50(4H,m),3,28-3,25(2H,m),2,72-2,68(1H,m),2,37-2,34(4H,m),2,19-2,16(3H,m),1,97-1,94(2H,m),1,49-1,43(2H,m),0,95-0,92(7H,m),0,81(9H,s),0,68-0,65(4H,m),0,19(3H,s),0,13(3H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 1324 $(M + H)^+$

[0581]

Paso 10: 1-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi) carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi) propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,136 g, 0,103 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,116 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,83(1H,s),7,57-7,52(1H,m),7,39-7,37(2H,m),7,30-7,29(2H,m),7,24-7,20(5H,m),6,88(2H,m),6,81(1H,s),6,54-6,51(1H,m),5,90-5,88(2H,m),5,76-5,74(1H,m),5,55-5,53(1H,m),5,33-5,05(3H,m),4,79-4,76(1H,m),4,63-4,60(4H,m),4,35-4,33(2H,m),4,22-4,19(3H,m),4,04-4,03(1H,m),3,88(3H,s),3,85-

3,83(6H,m),3,72(2H,m),3,62-3,56(4H,m),3,32-3,29(2H,m),2,70(1H,m),2,45-2,38(2H,m),2,30-2,27(2H,m),2,20-2,10(3H,m),1,94-1,89(4H,m),1,75-1,71(2H,m),0,95(7H,m),0,72-0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1210 $(M + H)^+$

[0582]

Paso 11: L-Prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenilo)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenilo}-L-leucinamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,116 g, 0,0958 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0530 g, 53 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,15(1H,s),8,11(1H,m),7,50-7,45(4H,m),7,32-7,31(2H,m),7,21(1H,s),7,13(2H,m),6,89(2H,m),6,37(1H,s),6,08(1H,s),5,88(1H,m),5,38(1H,m),4,69(1H,m), 4,63-4,60(1H,m),4,53-4,51(1H,m),4,31-4,28(1H,m),4,13-4,08(3H,m),3,89(3H,s),3,83(3H,s),3,81(3H,s),3,75-3,70(4H,m),3,57-3,55(3H,m),3,37-3,33(2H,m),3,01-2,99(1H,m),2,90-2,86(1H,m),2,76-2,73(1H,m),2,41(1H,m),2,17-2,15(3H,m),1,90-1,87(1H,m),1,74(4H,m),1,25(2H,m),0,97-0,91(7H,m),0,67(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1042 $(M + H)^+$

[0583]

Paso 12: N-[(9H-Fluoreno-9-iloxi)carbonil]glicilglicil-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-leucinamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 11 (0,0410 g, 0,0393 mmol) y N-[(9H-fluoreno-9-ilmetoxii)carbonil]glicilglicina (0,0410 g, 0,0393 mmol) in N,N-

dimetilformamida (1 mL), se añadieron monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,000602 g, 0,00393 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (0,00905 g, 0,0472 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo:metanol=100:0 a 90:10) para proporcionar el compuesto deseado (0,0520 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,57(1H,s),7,77-7,75(3H,m),7,63-7,61(2H,m),7,51-7,48(2H,m),7,40-7,38(3H,m),7,31-7,29(4H,m), 7,21-7,11(5H,m),6,88(2H,m),6,47(1H,s),6,08(1H,s),5,93(1H,m),5,21-5,19(1H,m),5,13(1H,m),4,78(1H,m),4,66-4,59(1H,m),4,53-4,51(1H,m),4,42-4,39(1H,m),4,33-4,31(1H,m),4,19-4,11(6H,m),4,10-3,86(4H,m),3,82(3H,s),3,76(3H,s),3,73-3,71(3H,m),3,56-3,51(7H,m),3,32-3,29(2H,m),2,73-2,69(1H,m),2,40(1H,m),2,29-2,27(3H,m),2,06-2,04(4H,m),1,73-1,70(2H,m),1,25(2H,m),0,96-0,93(6H,m),0,66(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1378 $(M + H)^+$

[0584]

Paso 13: Glicilglicil-L-prolil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-leucinamida

A una solución del compuesto obtenido en el paso 12 (0,0520 g, 0,0377 mmol) en N,N-dimetilformamida (2 ml), se añadió 1,8-diazabiciclo [5.4.0]-7-undeceno (67 μL, 0,0453 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,0420 g , 92 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,64(1H,s), 7,74(1H,m),7,66-7,64(1H,m),7,50(1H,s),7,45(1H,s),7,33-7,30(3H,m),7,24-7,21(2H,m),7,18-7,16(3H,m),6,89(2H,m),6,51(1H,s),6,15(1H,s),5,89(1H,m),5,27(1H,m),4,82-4,78(1H,m),4,74(1H,m),4,56-4,54(1H,m),4,49-4,47(1H,m),4,23-4,20(3H,m),4,13-4,10(3H,m),3,96-3,92(1H,m),3,90(3H,s),3,83(3H,s),3,76(3H,s),3,72(2H,m),3,62-3,56(5H,m),3,40-3,36(1H,m),3,31(1H,m),3,04(1H,m),2,90-2,86(1H,m),2,75-2,71(1H,m),2,42-2,39(1H,m),2,36(2H,s),2,29-2,27(3H,m),2,07-2,05(3H,m),1,97-1,95(1H,m),1,75-1,72(2H,m),0,94(6H,m),0,69(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1156 $(M + H)^+$

[0585]

Paso 14: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-prolil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-leucinamida

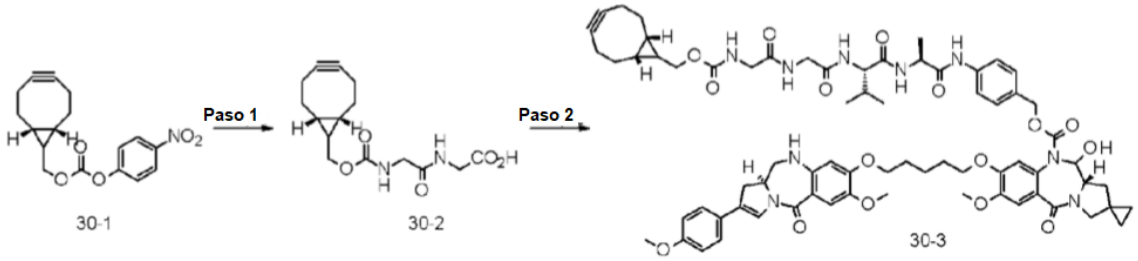
A una solución del compuesto obtenido en el paso 13 (0,0400 g, 0,0346 mmol) en N,N-dimetilformamida (1 ml), se añadieron 1-{[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocina-5(6H)-il) -4-oxobutanoil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (0.0140 g, 0.0346 mmol, Click Chemistry Tools) y diisopropilamina (0.0240 mL, 0.138 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución de reacción se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: metanol = 100:0 (v/v) a 90:10 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,0230 g, 46 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1443 $(M + H)^+$

[0586]

Ejemplo 30: Enlazador de fármacos 28

[Fórmula 154]




Paso 1: N-{[(1R,8S)-Biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmethoxi]carbonil}glicilglicine

A una solución de material de partida 30-1 (0,215 g, 0,682 mmol, Chemistry-A European Journal 2016, 22, 639) en N,N-dimetilformamida (4 ml), N, N-diisopropiletilamina (0,119 ml, 0,682 mmol), se añadieron glicil-glicina (0,0900 g, 0,682 mmol) y agua (2 ml), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

La solución de reacción se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo: CMA = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,205 g, 98 %). MS(APCI, ESI) m/z: 309 $(M + H)^+$

[0587]

Paso 2: N-{[(1R,8S)-Biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmethoxi]carbonil}glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-methoxi-8'-[(5-{[(11aS)-7-methoxy-2-(4- methoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,0180 g, 0,0587 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0420 g, 60 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,93(1H,s),8,25(1H,m),8,05(1H,s),7,85(1H,m),7,60-7,54(2H,m),7,45(1H,s),7,39-7,37(3H,m),7,29(1H,s),7,20(1H,m),7,04(1H,s),6,91(2H,m),6,72(1H,s),6,56-6,53(2H,m),6,31(1H,s),5,76-5,74(1H,m),5,19(1H,m), 4,80(1H,m),4,38-4,36(1H,m),4,23-4,21(2H,m),4,04(2H,m),3,95-3,92(3H,m),3,78-3,76(9H,m),3,66(3H,s),3,60(2H,m),3,55-3,52(2H,m),3,45-3,38(2H,m),3,26-3,23(1H,m),3,14(1H,m),2,77-2,74(1H,m),2,35-

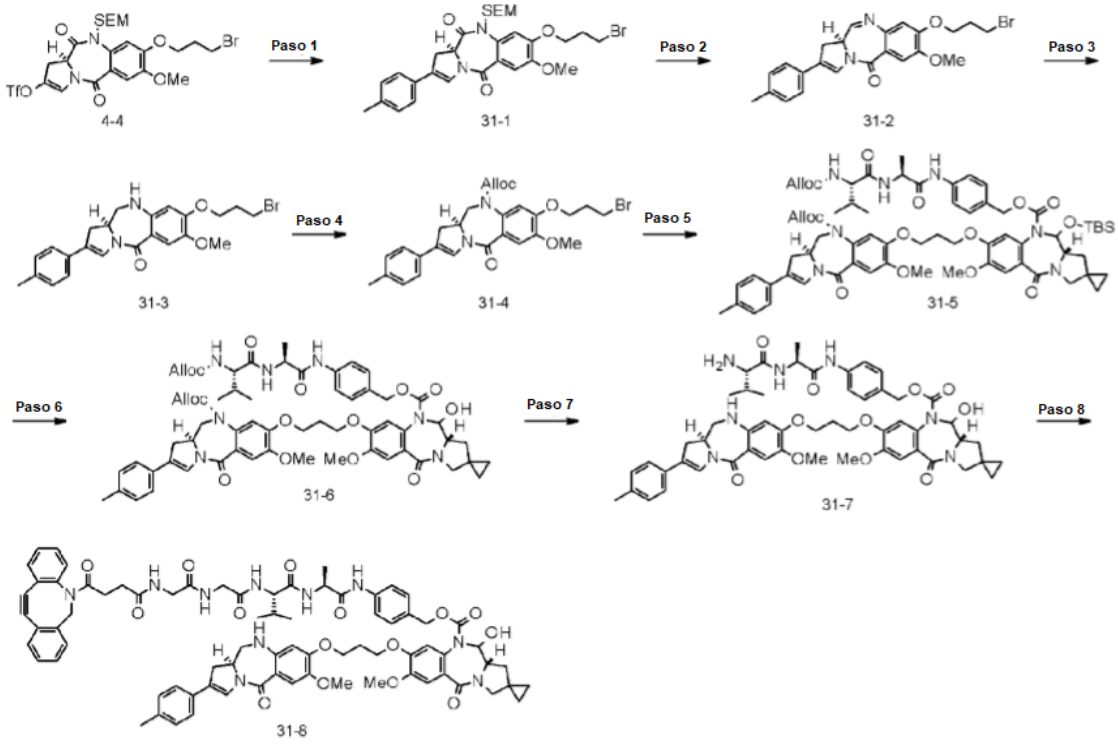
2,33(1H,m),2,20-2,11(6H,m),1,99-1,96(1H,m),1,81-1,78(4H,m),1,56-1,54(5H,m),1,29-1,26(4H,m),0,87-0,82(9H,m),0,67-0,62(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 1320 $(M + H)^+$

[0588]

Ejemplo 31: Enlazador de fármacos 29

[Fórmula 155]




Paso 1: Compuesto 31-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,00 g, 1,52 mmol) y el ácido 4-metilfenilborónico (0,309 g, 2,27 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,653 g, 72 %).

[0589]

Paso 2: Compuesto 31-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,653 g, 1,09 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,377 g, 76 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 457[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 455 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0590]

Paso 3: Compuesto 31-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,377 g, 0,828 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,311 g, 82 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 459[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 457 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0591]

Paso 4: Compuesto 31-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,311 g, 0,68 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,320 g, 87 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 543[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 541 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

Paso 5: Compuesto 31-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,0737 g, 0,136 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,145 g, 92 %). MS(APCI, ESI) m/z: 1272 $(M + H)^+$

[0592]

Paso 6: Compuesto 31-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,145 g, 0,114 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,122 g, 93 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1158 $(M + H)^+$

[0593]

Paso 7: Compuesto 31-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,122 g, 0,114 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0598 g, 53 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 990 $(M + H)^+$

[0594]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-

.

pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

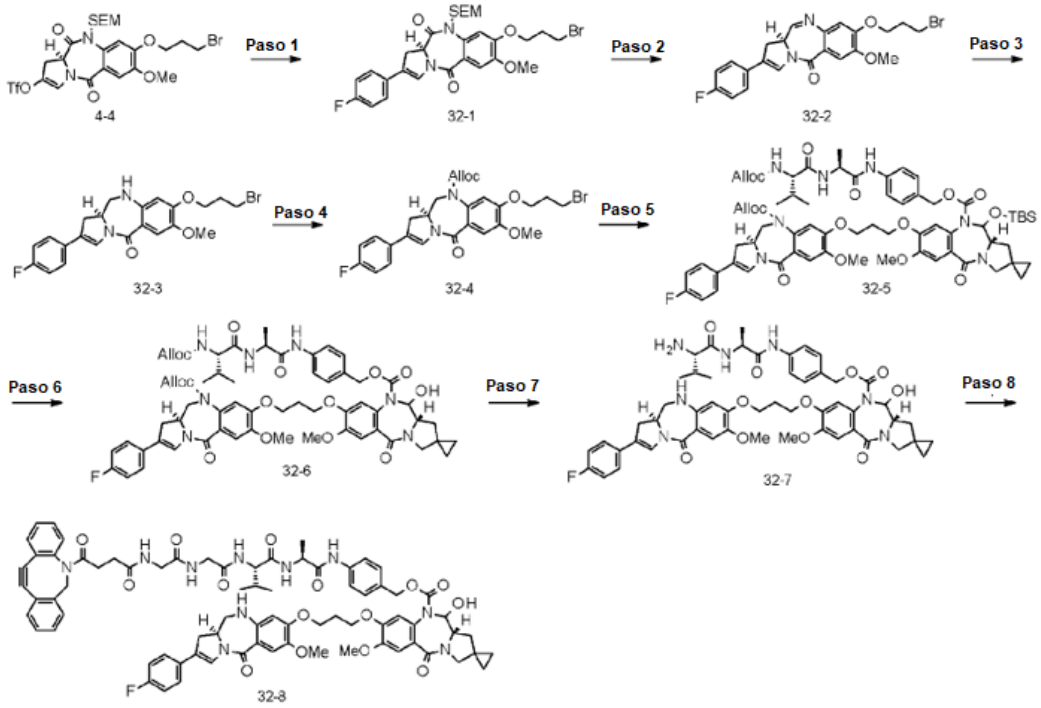
El compuesto obtenido en el paso 7 (0,0300 g, 0,0304 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0184 g, 44 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1391 $(M + H)^+$

[0595]

Ejemplo 32: Enlazador de fármacos 30

[Fórmula 156]




Paso 1: Compuesto 32-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,00 g, 1,52 mmol) y el ácido 4-fluorofenilborónico (0,318 g, 2,27 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,623 g, 68 %).

[0596]

Paso 2: Compuesto 32-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,623 g, 1,03 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,244 g, 52 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 461[$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 459 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0597]

Paso 3: Compuesto 32-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,244 g, 0,531 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,144 g, 59 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 463[$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 461 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0598]

Paso 4: Compuesto 32-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,144 g, 0,312 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,139 g, 82 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 547[$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 545 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0599]

Paso 5: Compuesto 32-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,0742 g, 0,136 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,138 g, 88 %). MS(APCI, ESI) m/z: 1284 (M + H)$^+$

[0600]

Paso 6: Compuesto 32-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,138 g, 0,108 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,109 g, 87 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1170 (M + H)$^+$

[0601]

Paso 7: Compuesto 32-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,109 g, 0,101 mmol) se hizo reaccionar de

la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0613 g, 61 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1002 $(M + H)^+$

[0602]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-8'-(3-{[(11aS)-2-(4-fluorofenil)-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina-8-il]oxi}propoxi)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

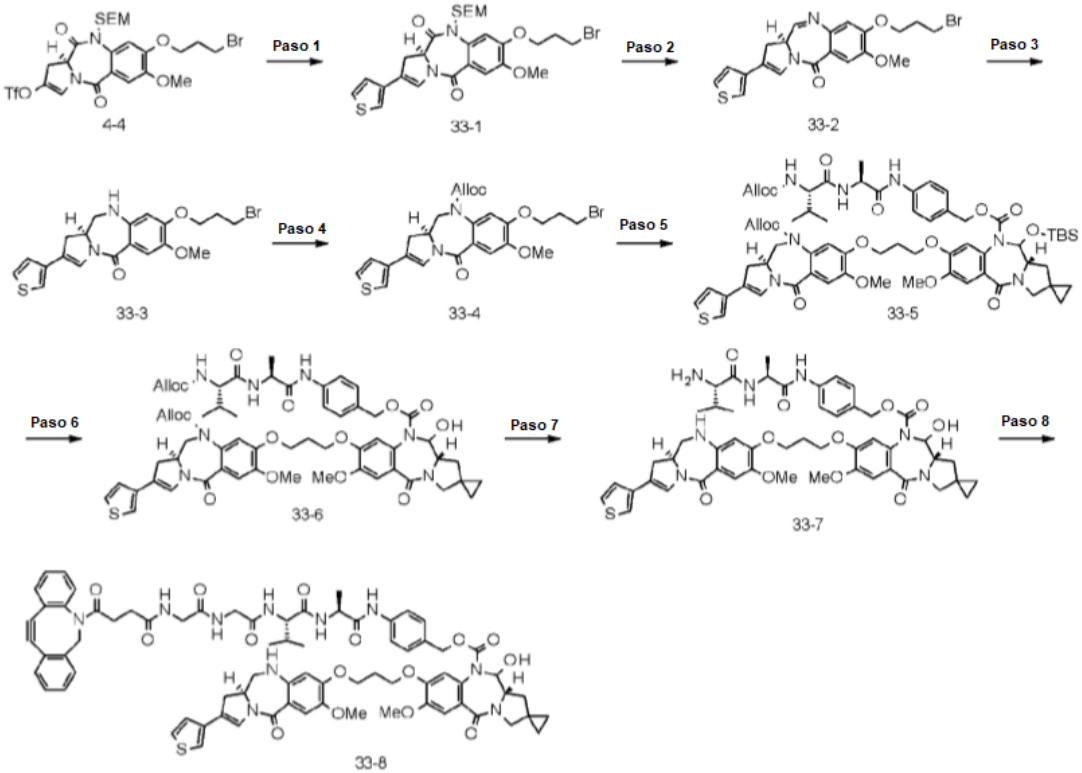
El compuesto obtenido en el paso 7 (0,0300 g, 0,0333 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0191 g, 45 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1402 $(M + H)^+$

[0603]

Ejemplo 33: Enlazador de fármacos 31

[Fórmula 157]




Paso 1: Compuesto 33-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,00 g, 1,52 mmol) y el ácido tiofeno-3-borónico (0,582 g, 4,55 mmol) se utilizaron y se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,611 g, 68 %). [0604]

Paso 2: Compuesto 33-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,611 g, 1,03 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,397 g, 86 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 449[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 447 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0605]

Paso 3: Compuesto 33-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,397 g, 0,887 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,341 g, 86 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 451[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 449 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0606]

Paso 4: Compuesto 33-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,341 g, 0,759 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,368 g, 91 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 535[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 533 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0607]

Paso 5: Compuesto 33-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,0726 g, 0,136 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,125 g, 80 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1260 $(M + H)^+$

[0608]

Paso 6: Compuesto 33-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,125 g, 0,0992 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,109 g, 96 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1146 $(M + H)^+$ [0609]

Paso 7: Compuesto 33-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,109 g, 0,0951 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0723 g, 78 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,13-9,04(1H,m),7,89-7,87(1H,m),7,47-7,42(4H,m),7,27-7,23(3H,m),7,18(1H,s),7,12-7,08(2H,m),6,97-6,96(1H,m),6,42-6,37(1H,m),6,08-6,04(1H,m),5,86-5,84(1H,m),5,34-5,31(1H,m),4,65-4,58(3H,m),4,23-3,95(5H,m),3,85(3H,s),3,75-3,69(6H,m),3,57-3,47(3H,m),3,34-3,29(3H,m),2,72-2,68(1H,m),2,38-2,29(2H,m),2,15-2,14(2H,m),1,72-1,69(1H,m),1,40-1,38(3H,m),0,96-0,95(3H,m),0,80-0,61(7H,m).

[0610]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-5-oxo-2-(tiofeno-3-il)-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il] oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

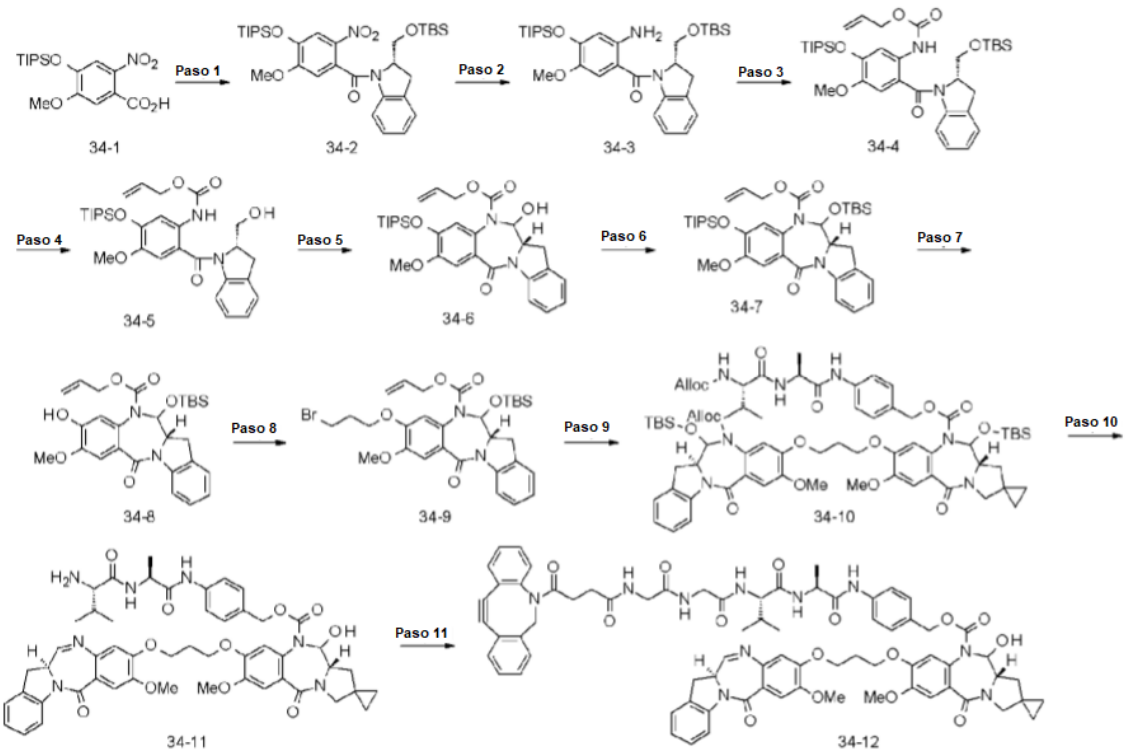
El compuesto obtenido en el paso 7 (0,0300 g, 0,0307 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0101 g, 24 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1379 $(M + H)^+$

[0611]

Ejemplo 34: Enlazador de fármacos 32

[Fórmula 158]




Paso 1: Compuesto 34-2

A una solución de material de partida 34-1 (4,00 g, 10,8 mmol, US 20150283262) en diclorometano (100 ml), se añadieron N,N-dimetilformamida (0,2 ml) y cloruro de oxalilo (2,75 g, 21,7 mmol) a 0 °C, agitando después a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de que el disolvente se removió por destilación a presión reducida, el residuo se secó a presión reducida y se disolvió en diclorometano (60 ml). A esto, se añadieron (2S)-2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-2,3-dihidro-1H-indol (4,28 g, 16,2 mmol, Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 14264) y trietilamina (1,64 g, 16,2 mmol) a 0 °C, agitando después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió agua a la solución de reacción, la cual se extrajo con diclorometano. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 80:20 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (6,10 g, 92 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 615 $(M + H)^+$

[0612]

Paso 2: Compuesto 34-3

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (6,10 g, 9,90 mmol) en etanol (100 ml), se añadió carbono de paladio al 5 % (contenido de humedad: 54 %, 1,00 g) bajo la atmósfera de nitrógeno, y la solución de reacción se agitó luego bajo la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de que la solución de reacción se filtró a través de un Celite, el filtrado se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (5,80 g, cuantitativo).

MS (APCI, ESI) m/z: 585 $(M + H)^+$

[0613]

Paso 3: Compuesto 34-4

El compuesto obtenido en el paso 2 (2,90 g, 5,00 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,20 g, 96 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,26(1H,s),7,78(1H,s),7,18-7,17(1H,m),6,94-6,83(3H,m),5,94-5,90(1H,m),5,35-5,19(2H,m),4,74(1H,m),4,65-4,60(2H,m),3,76-3,61(6H,m),3,31-3,27(1H,m),3,10(1H,m),1,35-1,17(3H,m),1,10(18H,m),0,79-0,70(9H,m),-0,03(3H,s),-0,08(3H,s).

[0614]

Paso 4: Compuesto 34-5

El compuesto obtenido en el paso 3 (3,20 g, 4,80 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,32 g, 87 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 555 $(M + H)^+$

[0615]

Paso 5: Compuesto 34-6

El compuesto obtenido en el paso 4 (2,32 g, 4,18 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,68 g, 73 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 553 $(M + H)^+$

[0616]

Paso 6: Compuesto 34-7

El compuesto obtenido en el paso 5 (1,68 g, 3,04 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (2,32 g, cuantitativo).
$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,16(1H,m),7,28-7,20(3H,m),7,09-7,07(1H,m),6,70(1H,s),5,80-5,76(2H,m),5,14-5,12(2H,m),4,60(1H,m),4,37(1H,m),4,01-3,99(1H,m),3,87(3H,s),3,45-3,41(1H,m),2,99-2,95(1H,m),1,28-1,23(3H,m),1,10-1,07(18H,m),0,92(9H,s),0,26(3H,s),0,19(3H,s).
[0617]
Paso 7: Compuesto 34-8

El compuesto obtenido en el paso 6 (2,32 g, 3,48 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,42 g, 80 %).
MS (APCI, ESI) m/z: 511 $(M + H)^+$

[0618]

Paso 8: Compuesto 34-9

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,720 g, 1,41 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,580 g, 65 %).
MS(APCI, ESI) m/z: 633[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 631 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].
[0619]
Paso 9: Compuesto 34-10

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,235 g, 0,371 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 10 para proporcionar el compuesto deseado (0,347 g, 83 %).
MS (APCI, ESI) m/z: 1359 $(M + H)^+$

[0620]

Paso 10: Compuesto 34-11

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,347 g, 0,255 mmol) se hizo reaccionar de la

misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar una forma desprotegida de sililo (0,265 g, 92 %).

La forma desprotegida de sililo (0,265 g, 0,234 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,086 g, 39 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 944 $(M + H)^+$

[0621]

Paso 11: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(5aS)-10-metoxi-12-oxo-5a,12-dihidro-5H-indolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-9-il] oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonilo}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

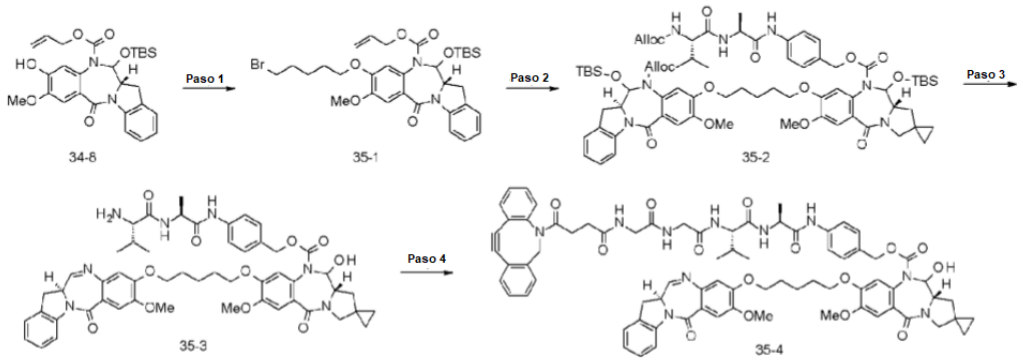
El compuesto obtenido en el paso 10 (0,0860 g, 0,0911 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0800 g, 65 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1345 $(M + H)^+$

[0622]

Ejemplo 35: Enlazador de fármacos 33

[Fórmula 159]




Paso 1: Compuesto 35-1

El compuesto obtenido en el paso 7 del Ejemplo 34 (0,700 g, 1,37 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,790 g, 87 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 661[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 659 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0623]

Paso 2: Compuesto 35-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,245 g, 0,371 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,368 g, 86 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1387 $(M + H)^+$

[0624]

Paso 3: Compuesto 35-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,368 g, 0,265 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 11 y 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,180 g, 81 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 972 (M + H)+

[0625]

Paso 4: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b, f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(5aS)-10-metoxi-12-oxo-5a,12-dihidro-5H-indolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-9-il] oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonilo}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

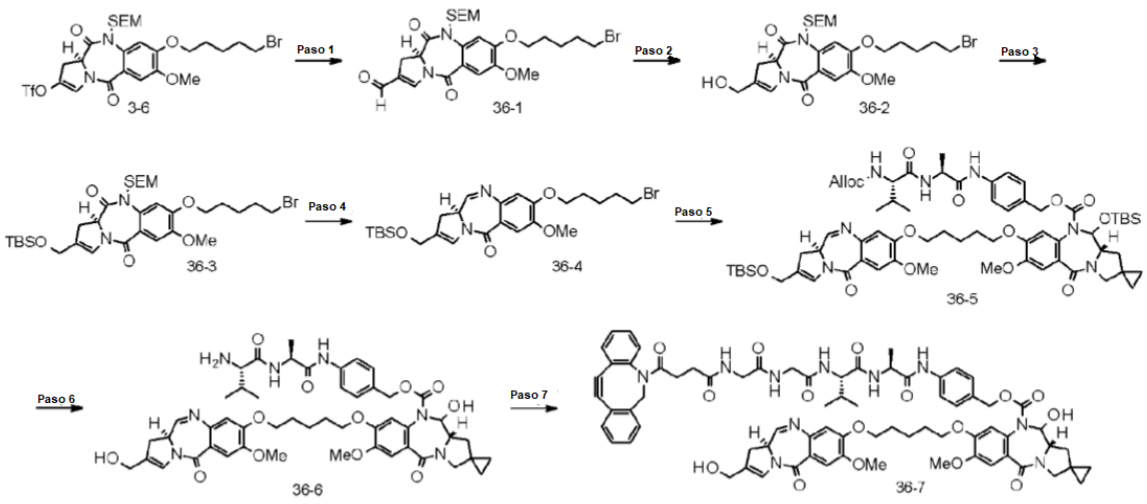
El compuesto obtenido en el paso 3 (0,0700 g, 0,0720 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0440 g, 44 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1373 $(M + H)^+$

[0626]

Ejemplo 36: Enlazador de fármacos 34

[Fórmula 160]




Paso 1: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-7-metoxi-5,11-dioxo-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina-2-carbaldehído

El compuesto obtenido en el paso 5 del Ejemplo 3 (3,54 g, 5,15 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (52 ml), a lo que se añadió N-formilsacarina (5,44 g, 25,7 mmol), acetato de paladio (0,0578 g, 0,257 mmol), 1,4-bis (difenilfosfino) butano (0,154 g, 0,360 mmol), carbonato de sodio (2,73 g, 25,7 mmol) y trietilsilano (1,20 g, 10,3 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, y la solución de reacción se extrajo con acetato de etilo, y el extracto se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 40:60 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,760 g, 26 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:9,74(1H,s),7,79(1H,s),7,32(1H,s),7,24(1H,s),5,54(1H,m),4,76-4,69(2H,m),4,07-4,05(2H,m),3,93(3H,s),3,83-3,65(3H,m),3,45(2H,m),3,02-2,98(1H,m),1,95-1,91(4H,m),1,69-1,58(2H,m),1,02-0,92(2H,m),0,06-0,03(9H,m).

[0627]

Paso 2: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-2-(hidroximetil)-7-metoxi-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-5,11(10H,11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,760 g, 1,34 mmol) se disolvió en diclorometano (14 ml), al cual se añadió borohidruro de sodio (0,101 g, 2,68 mmol) a -78 °C, y la temperatura se elevó a temperatura ambiente. A la solución de reacción se añadió ácido clorhídrico 1N, y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,432 g, 57 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,23(1H,s),6,93(1H,s), 5,53(1H,m),4,67(1H,m),4,57-4,54(1H,m),4,32-4,31(2H,m),4,10-4,01(2H,m),3,92(3H,s),3,83-3,57(3H,m),3,45(2H,m),2,90-2,88(1H,m),1,99-1,88(4H,m),1,69-1,61(2H,m),1,00-0,98(2H,m),0,03(9H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 571[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 569 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0628]

Paso 3: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-7-metoxi-10-{[2- (trimetilsilil)etoxi]metil}-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-5,11(10H,11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,432 g, 0,758 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (8 ml), a lo que se añadieron imidazol (0,0775 g, 1,14 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (0,137 g, 0,910 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió agua a la solución de reacción, y la solución de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de magnesio.

Después de la destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó mediante

cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 30:70 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,485 g, 94 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,35(1H,s),7,22(1H,s),6,87(1H,m), 5,53(1H,m),4,68(1H,m),4,54-4,52(1H,m),4,33-4,28(2H,m),4,11-4,00(2H,m),3,92(3H,s),3,80-3,78(1H,m),3,69-3,66(1H,m),3,52-3,50(1H,m),3,45(2H,m),2,86-2,82(1H,m),1,99-1,87(4H,m),1,68-1,60(2H,m),1,00-0,98(2H,m),0,91(9H,s),0,09(6H,m),0,04(9H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 685[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 683 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0629]

Paso 4: (11aS)-8-[(5-bromopentil)oxi]-2-({[terc-butil (dimetil) silil]oxi} metil) -7-metoxi-1,11a-dihidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,103 g, 0,151 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0590 g, 73 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,83(1H,m),7,51(1H,s),6,92(1H,m),6,79(1H,s),4,32-4,30(3H,m),4,12-4,04(2H,m),3,93(3H,s),3,86-3,84(1H,m),3,46-3,39(2H,m),3,26-3,23(1H,m),3,07-3,03(1H,m),1,97-1,85(4H,m),1,68-1,63(2H,m),0,92(9H,s),0,09(6H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 539[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 537 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0630]

Paso 5: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4 -[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-[(5-{[(11aS)-2-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepin-8-il]oxi}pentil)oxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'- pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L- alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,251 g, 0,467 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,300 g, 51 %).

[0631]

Paso 6: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-8'-[(5-{[(11aS)-2-(hidroximetil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-

il]oxi}pentil)oxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,300 g, 0,237 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 11 y 12 del Ejemplo 33 para proporcionar el compuesto deseado (0,0540 g, 53 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 952 $(M + H)^+$

[0632]

Paso 7: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-8'-(5-{[(11aS)-2-(hidroximetil)-7-metoxi-5-oxo-5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina-8-il]oxi}penti)oxi)]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

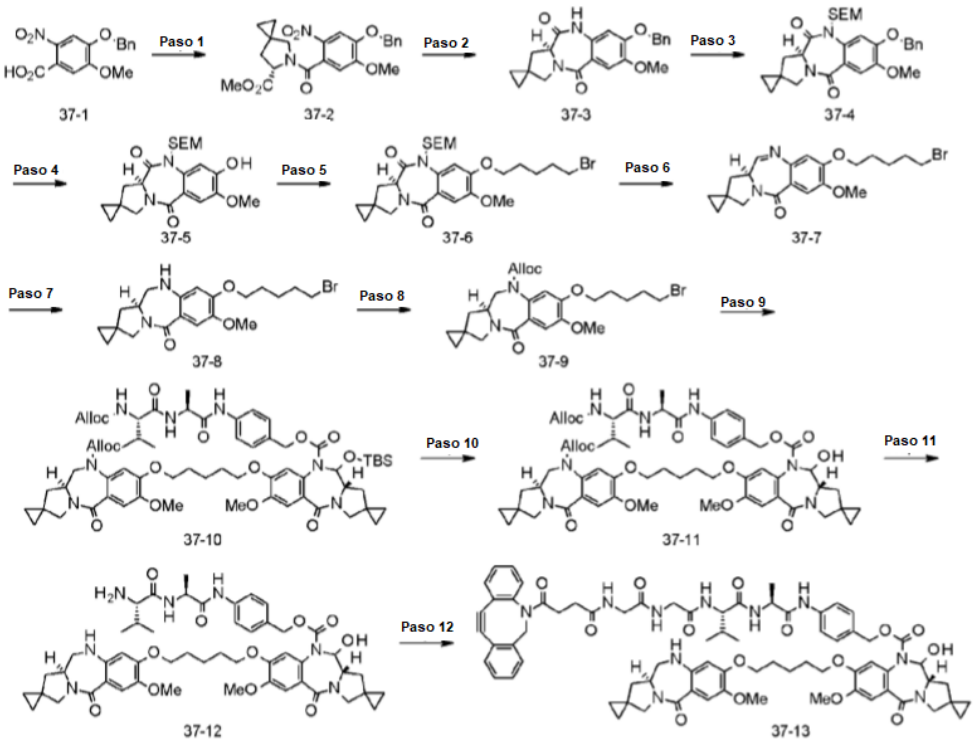
El compuesto obtenido en el paso 6 (0,0500 mg, 0,0525 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0340 mg, 48 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1351 $(M- H)^-$

[0633]

Ejemplo 37: Enlazador de fármacos 35

[Fórmula 161]




Paso 1: Metil (6S)-5-[4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoil]-5-azaspiro[2.4]heptano-6-carboxilato

A una solución de ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico (6,07 g, 20,0 mmol, Tetrahedron 1995, 51, 5617) y N, N-dimetilformamida (1,08 mL, 13,9 mmol) en diclorometano (100 mL ), se añadió cloruro de oxalilo (3,43 ml, 40,0 mmol) gota a gota enfriándose con hielo durante 5 minutos. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, y luego se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en diclorometano (20 ml), lo cual se destiló a presión reducida. Después de repetir esta operación tres veces, el residuo se suspendió en diclorometano (5 ml), a lo que se añadieron cantidades excesivas de éter dietílico y hexano, y la siguiente filtración y secado a presión reducida proporcionó el cloruro de acilo en bruto. El cloruro de acilo obtenido se disolvió en diclorometano y se enfrió a -40 °C (baño de acetonitrilo - hielo seco), a lo que se añadieron gradualmente metil (6S)-5-azaspiro[2.4]clorhidrato de heptano-6-carboxilato (4,22 g, 22,0 mmol, Tetrahedron

Letters 2012. 53. 3847) y trietilamina (3,36 mL, 24,2 mmol). La temperatura de la mezcla de reacción se elevó a temperatura ambiente durante la noche. A la mezcla de reacción, se añadió ácido clorhídrico 1 N, y la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua, un hidrogeno carbonato de sodio acuoso saturado y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 a 50:50] para proporcionar el compuesto deseado (6,55 g, 80 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 441 $(M + H)^+$

[0634]

Paso 2: (11a'S)-8'-(Benciloxi)-7'-metoxi-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-5',11' (10'H,11a'H)-diona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 (6,55 g, 16,0 mmol) en etanol (150 mL) y THF (150 mL), se añadió níquel Raney (7,00 g) en la atmósfera de nitrógeno.

Se añadió monohidrato de hidrazina (7 mL) a la mezcla de reacción, y la temperatura se aumentó gradualmente a 50 °C. Después de agitar a 50 °C durante 2 horas, se añadieron a la misma níquel Raney (3,00 g) y monohidrato de hidrazina (3 mL), y el resultante se agitó durante 1 hora. Se añadió THF (100 mL) a la mezcla de reacción, que se filtró a través de un Celite. El resultante se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (4.42 g, 73 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,82(1H,s),7,48(1H,s),7,42-7,35(4H,m),7,32-7,31(1H,m),6,44(1H,s),5,16(2H,s),4,16-4,10(1H,m),3,93(3H,s),3,78-3,76(1H,m),3,39-3,37(1H,m),2,45-2,43(1H,m),2,24-2,21(1H,m),0,83-0,61(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 379 $(M + H)^+$

[0635]

Paso 3: (11a'S)-8'-(Benciloxi)-7'-metoxi-10'-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-5',11'(10'H,11a'H)-diona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 2 (10,0 g, 26,4 mmol) en THF (150 mL), se añadió lentamente gota a gota una solución de hexano normal de 2,6 mol/l de butil litio normal (12,0 mL, 31,8 mmol) a -40 °C. La solución de reacción se agitó a -40 °C durante 15 minutos y luego se añadió lentamente gota a gota 2-(clorometoxi)etiltrimetilsilano (5,57 ml, 31,7 mmol). Después de agitar la solución de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, se añadió agua a la misma y el resultante se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 30:70 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (11,8 g, 88 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,45-7,44(2H,m),7,37-7,32(4H,m),7,28(1H,s),5,48-5,46(1H,m),5,21(2H,s),4,50-4,48(1H,m),4,22-4,20(1H,m),3,95(3H,s),3,73-3,70(2H,m),3,62-3,60(1H,m),3,41-3,38(1H,m),2,45-2,43(1H,m),2,23-2,20(1H,m),0,98-0,96(2H,m),0,83-0,68(4H,m),0,04(9H,s).

MS (APCI, ESI) m/z: 509 $(M + H)^+$

[0636]

Paso 4: (11a'S) -8'-Hidroxi-7'-metoxi-10'-{[2- (trimetilsilil)etoxi] metil}-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5',11'(10'H,11a'H)-diona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 3 (18,7 g, 36,8 mmol) en THF (50 mL) y etanol (100 mL), se añadió un catalizador de paladio carbono al 5 % (5,00 g) en la atmósfera de nitrógeno. El globo de nitrógeno se reemplazó inmediatamente con un globo de hidrógeno, y la mezcla de reacción se agitó bajo la atmósfera de hidrógeno durante 6 horas. La mezcla de reacción se diluyó mediante la adición de cloroformo y se filtró a través de un Celite, y el filtrado se destiló luego a presión reducida, y el

residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 25:75 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (15,1 g, 98 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,38(1H,s),7,28(1H,s),6,01(1H,s),5,49-5,47(1H,m),4,70-4,68(1H,m),4,24-4,22(1H,m),3,96(3H,s),3,76-3,71(2H,m),3,66-3,64(1H,m),3,42-3,39(1H,m),2,47-2,45(1H,m),2,23-2,21(1H,m),1,01-0,99(2H,m),0,89-0,63(4H,m),0,03(9H,s).

MS (APCI, ESI) m/z: 419 $(M + H)^+$

[0637]

Paso 5: (11a'S)-8'-[(5-bromopentil)oxi]-7'-metoxi-10'-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5',11'(10'H,11a'H)-diona

El compuesto obtenido en el paso 4 (2,77 g, 6,62 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,31 g, 88 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,36(1H,s),7,25(1H,s),5,55(1H,m),4,65(1H,m),4,24-4,23(1H,m),4,11-4,03(2H,m),3,93(3H,s),3,85-3,78(1H,m),3,72-3,69(2H,m),3,46-3,39(3H,m),2,47-2,44(1H,m),2,25-2,22(1H,m),1,95-1,91(4H,m),1,67-1,59(1H,m),1,03-0,95(2H,m),0,90-0,85(1H,m),0,70-0,66(4H,m),0,05(9H,s).

[0638]

Paso 6: (11a'S)-8'-[(5-bromopentil)oxi]-7'-metoxi-1',11a'-dihidro-5'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 5 (3,31 g, 5,83 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,11 g, 45 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7.81(1H,m),7,53(1H,s),6,82(1H,s),4,13-4,06(2H,m),3,97(3H,s),3,88-3,83(1H,m),3,69(1H,m),3,52-3,39(3H,m),2,55-2,52(1H,m),2,06-1,89(5H,m),1,67-1,63(2H,m),0,76-0,72(4H,m).

[0639]

Paso 7: (11a'S)-8'-[(5-bromopentil)oxi]-7'-metoxi-1',10',11',11a'-tetrahidro-5'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 6 (2,56 g, 6,08 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,15 g, 45 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,60(1H,s),6,07(1H,s),4,11-4,04(1H,m),3,99(2H,m),3,87-3,84(1H,m),3,85(3H,s),3,73(1H,m),3,58-3,53(2H,m),3,47-3,42(3H,m),2,03-1,78(6H,m),1,65-1,63(2H,m),0,77-0,56(4H,m).

[0640]

Paso 8: Prop-2-en-1-il (11a'S)-8'-[(5-bromopentil)oxi]-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano -1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 7 (1,15 g, 2,72 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,14 g, 82 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,23(1H,s),6,69(1H,s),5,79(1H,s),5,13-5,10(2H,m),4,68-4,66(1H,m),4,48-4,45(2H,m),4,01(2H,m),3,92(3H,s),3,76(1H,m),3,54-3,37(3H,m),2,39(1H,m),1,95-1,90(4H,m),1,68-1,61(3H,m),1,44(1H,m),0,75-0,66(4H,m).

[0641]

Paso 9: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4 -[({[(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-{[5-({(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-10'-[(prop-2- en-1-iloxi)carbonil]-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina]-8'-il}oxi)pentil]oxi}-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,374 g, 0,737 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,589 g, 65 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1234 $(M + H)^+$

[0642]

Paso 10: N-[(Prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-L-valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-{[5-({(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-10'-[(prop-2-en-1-iloxi) carbonilo]-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-8'-il}oxi)pentil]oxi}-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,589 g, 0,477 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,382 g, 71 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,90(1H,s),7,55(2H,m),7,25-7,21(2H,m),6,74(2H,m),6,38(1H,s),5,90-5,87(5H,m),5,33-5,09(8H,m),4,66-4,60(8H,m),3,98-3,91(10H,m),3,77-3,30(12H,m),2,42-2,36(2H,m),1,77-1,39(6H,m),0,91-0,70(14H,m).

[0643]

Paso 11: L-Valil-N-{4-[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8 '-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-8'-il] oxi}pentil)oxi] -5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 10 (0,382 g, 0,341 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,200 g, 62 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 952 $(M + H)^+$

[0644]

Paso 12: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b, f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-

{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiacepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

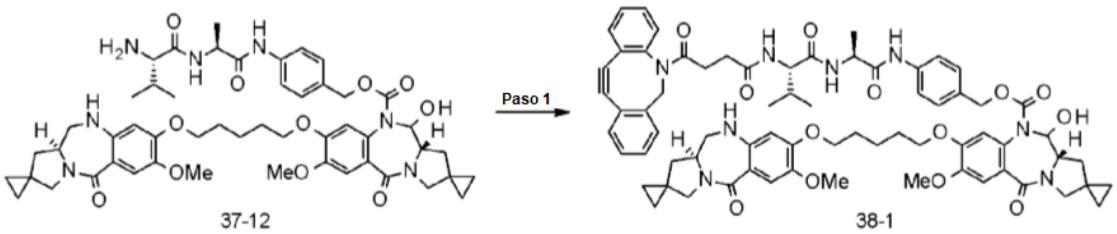
El compuesto obtenido en el paso 11 (0,0560 g, 0,0588 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0500 g, 63 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1354 $(M + H)^+$

[0645]

Ejemplo 38: Enlazador de fármacos 36

[Fórmula 162]




Paso 1: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocina-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]-L-valil-N-{4- [({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8 '-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11', 11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiazepina] -8'-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

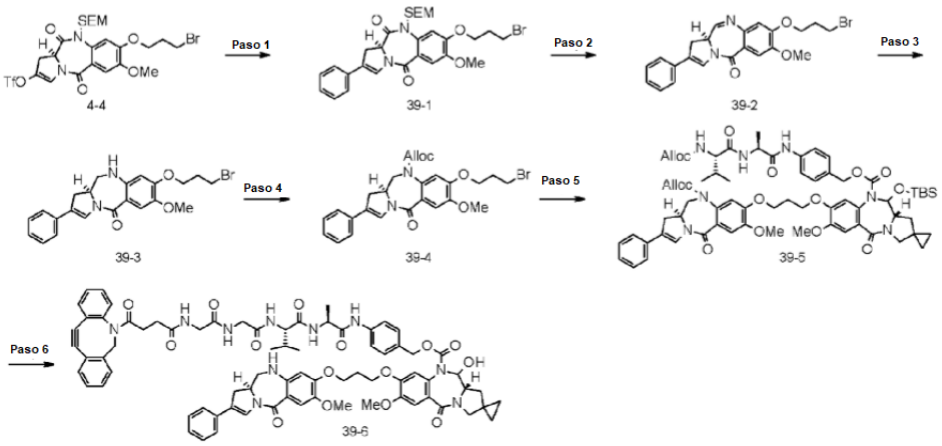
El compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 37 (0,0410 g, 0,0430 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 6 para proporcionar el compuesto deseado (0,0210 g, 39 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1240 $(M + H)^+$

[0646]

Ejemplo 39: Enlazador de fármacos 37

[Fórmula 163]




Paso 1: Compuesto 39-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,00 g, 1,52 mmol) y el ácido fenil borónico (0,370 g, 3,03 mmol) se utilizaron y se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,726 g, 81 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 589[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 587 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0647]

Paso 2: Compuesto 39-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,726 g, 1,24 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,344 g, 63 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 443[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 441 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0648]

Paso 3: Compuesto 39-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,344 g, 0,779 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,248 g, 72 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 445[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 443 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0649]

Paso 4: Compuesto 39-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,248 g, 0,559 mmol) se hizo reaccionar de la

misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,267 g, 90 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 529[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 527 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0650]

Paso 5: Compuesto 39-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,100 g, 0,190 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,201 g, 85 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1255 $(M + H)^+$

[0651]

Paso 6: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valill-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-5-oxo-2-fenil-5,10-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxo)metil] fenil}-L-alaninamida

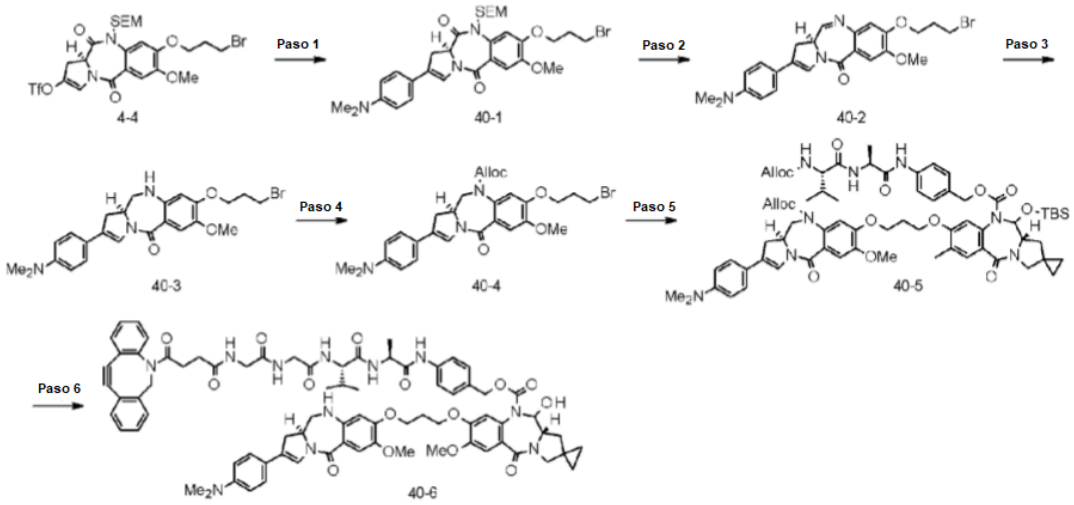
El compuesto obtenido en el paso 5 (0,201 g, 0,160 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 11, 12, y 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,080 g, 36 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1372 $(M + H)^+$

[0652]

Ejemplo 40: Enlazador de fármacos 38

[Fórmula 164]




Paso 1: Compuesto 40-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (1,48 g, 2,24 mmol) y el ácido 4-(dimetilamino)fenilborónico (0,741 g, 4,49 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,520 g, 37 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 632[$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 630 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0653]

Paso 2: Compuesto 40-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,520 g, 0,825 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,167 g, 42 %). [0654]

Paso 3: Compuesto 40-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,167 g, 0,345 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0650 g, 39 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 488[$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 486 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0655]

Paso 4: Compuesto 40-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,0650 g, 0,134 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0690 g, 90 %). MS(APCI, ESI) m/z: 572[$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 570 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0656]

Paso 5: Compuesto 40-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,0690 g, 0,121 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0660 g, 42 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1297 $(M + H)^+$

[0657]

Paso 6: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b, ]azocin-5(6H)-il) -4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-8 '-[3 ({(11aS)-2-[4-(dimetilamino) fenil]-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina-8-il}oxi)propoxi]-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiacepina ]-10 '(5'H)-il]carbonil} oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

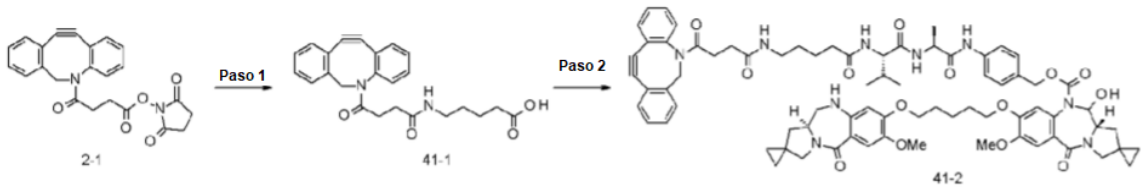
El compuesto obtenido en el paso 5 (0,0660 g, 0,0509 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 11, 12, y 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0350 g, 49 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 1417 $(M + H)^+$

[0658]

Ejemplo 41: Enlazador de fármacos 39

[Fórmula 165]




Paso 1: Aducto de N,N-dimetilformamida del ácido 5-{[4-(11,12-didehidrodibenzo [b, f] azocina-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]amino}valérico

En N,N-dimetilformamida (10 mL), se disolvió ácido 5-aminovalérico (0,436 g, 3,72 mmol), al cual se añadieron 1-{[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f] azocina-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]oxi}pirrolidin-2,5-diona (1,36 g, 3,38 mmol) y trietilamina (0,937 mL, 6,76 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. A la solución de reacción, se añadió ácido clorhídrico 1 N, que se extrajo con cloroformo, y la capa orgánica obtenida se lavó con agua y salmuera y luego se secó sobre sulfato de magnesio. Después de la destilación a presión reducida,

el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [capa orgánica para distribución con cloroformo - cloroformo:metanol:agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,730 g, 45 %) como un sólido.

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,06(1H,s),7,71(1H,m),7,54-7,52(1H,m),7,46-7,32(6H,m),6,04(1H,m),5,18(1H,m),3,72(1H,m),3,17-3,10(2H,m),3,00(3H,s),2,92(3H,s),2,84-2,80(1H,m),2,45-2,34(3H,m),2,28-2,24(1H,m),2,03-1,99(1H,m),1,66-1,58(2H,m),1,47-1,40(2H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 405 $(M + H)^+$

[0659]

Paso 2: N-(5-{[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocina-5(6H)-il)-4-oxobutanoil]amino}pentanoil)-L-valil-N-{4 -[({[(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4] benzodiacepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil]fenil}-L-alaninamida

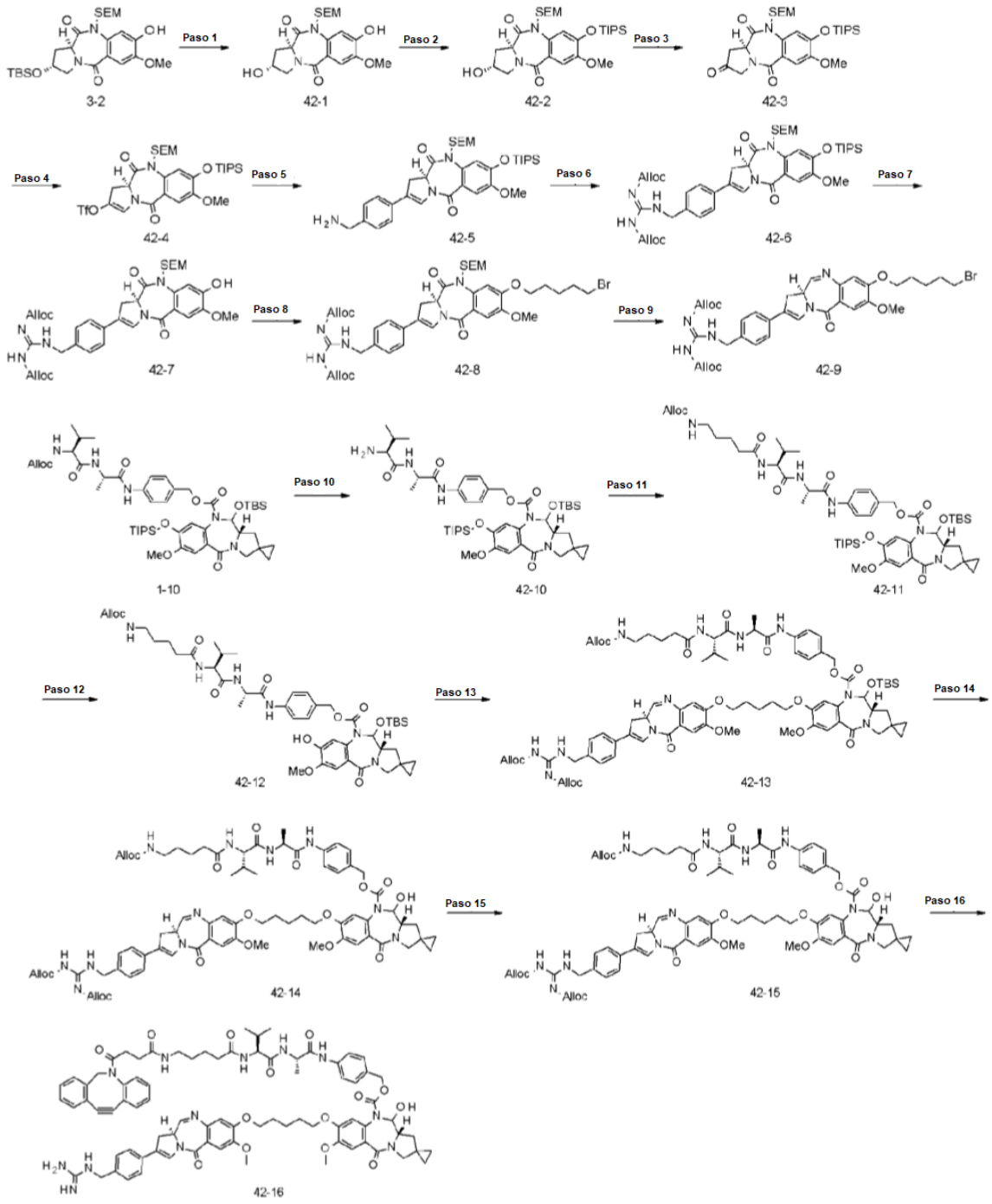
El compuesto obtenido en el paso 1 (0,0176 g, 0,0368 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,00880 g, 18 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1339 $(M + H)^+$

[0660]

Ejemplo 42: Enlazador de fármacos 40

[Fórmula 166]




Paso 1: Compuesto 42-1

El compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 3 (5,00 g, 9,66 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,95 g, 100 %). MS (APCI, ESI) m/z: 409 $(M + H)^+$

[0661]

Paso 2: Compuesto 42-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (3,95 g, 9,67 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 24 para proporcionar el compuesto deseado (4,78 g, 87 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 565 $(M + H)^+$

[0662]

Paso 3: Compuesto 42-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (4,78 g, 8,43 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 4 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (2,36 g, 50%).

MS (APCI, ESI) m/z: 563 $(M + H)^+$

[0663]

Paso 4: Compuesto 42-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (1,53 g, 2,72 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (1,27 g, 69 %).

$^1$H-RMN(CDCl3)δ:7,31(2H,s),7,15(1H,m),5,52(1H,m), 4,65(1H,m),4,57(1H,m),3,95-3,89(1H,m),3,87(3H,s),3,75-3,58(2H,m),3,18-3,14(1H,m),1,33-1,25(3H,m),1,10(18H,m),1,00-0,96(2H,m),0,03(9H,s).

[0664]

Paso 5: Compuesto 42-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,255 g, 0,367 mmol) y el ácido 4- (aminometil) fenilborónico (0,344 g, 1,84 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,148 g, 62 %). MS (APCI, ESI) m/z: 652 $(M + H)^+$

[0665]

Paso 6: Compuesto 42-6

A una solución del compuesto (0,142 g, 0,218 mmol) obtenido en el paso 5 y diprop-2-en-1-il [(Z),-(metilsulfanil)metilideno]biscarbamato (0,079 g, 0,079 mmol, WO 9920628) en dimetilformamida (2,2 ml), se añadieron trietilamina (0,090 ml, 0,653 mmol) y cloruro de mercurio (II) (0,083 g, 0,305 mmol) a temperatura ambiente.

Después de que la solución de reacción se agitara a temperatura ambiente durante 30 minutos, la solución de

reacción se diluyó mediante la adición de acetato de etilo, y las sales de mercurio se eliminaron por filtración. La capa orgánica obtenida se lavó con tampón fosfato 0,1 N y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 60:40 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,157 g, 83 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 863 $(M + H)^+$

[0666]

Paso 7: Compuesto 42-7

A una solución del compuesto obtenido en el paso 6 (0,153 g, 0,177 mmol) en THF (1,8 mL), se añadió una solución de tetrahidrofurano 1 mol/L de fluoruro de tetrabutilamonio (0,266 mL, 0,266 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 50 minutos, se añadió tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) a la solución de reacción, la cual se extrajo con acetato de etilo, y la capa orgánica obtenida se lavó con tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0). El resultante se secó sobre sulfato de sodio, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,115 g, 92 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 706 $(M + H)^+$

[0667]

Paso 8: Compuesto 42-8

A una solución del compuesto obtenido en el paso 7 (0,115 g, 0,163 mmol) en N,N-dimetilformamida (1,0 mL), 1,5-dibromopentano (0,088 mL, 0,652 mmol) y carbonato de cesio (0,032 g, 0,098 mmol ) se añadieron a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, se agregó tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) a la solución de reacción, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con tampón fosfato 0,1 N (pH de 7,0) y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó

por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,111 g, 80 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 856 [$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 854 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$]

[0668]

Paso 9: Compuesto 42-9

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,105 g, 0,123 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,036 g, 41 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 772 [$^{81}$Br,(M + H)$^+$], 770 [$^{79}$Br,(M + H)$^+$].

[0669]

Paso 10: Compuesto 42-10

El compuesto obtenido en el paso 9 (0,163 g, 0,169 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,132 g, 88 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 880 (M + H)$^+$

[0670]

Paso 11: Compuesto 42-11

A una solución del compuesto obtenido en el paso 10 (0,13 g, 0,147 mmol), ácido 5-{[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]amino}pentanoico (0,0386 g, 0,192 mmol) y se añadieron 1-hidrohidrobenzotriazol monohidrato (0,038 g, 0,251 mmol) en diclorometano (3 mL), trietilamina (0,035 ml, 0,251 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3- (3- dimetilaminopropil) carbodiimida (0,048 g, 0,251 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la solución de reacción, se añadió tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) y el resultante se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) y el acetato de etilo se destiló a presión reducida. El resultante se hizo azeótropo con tolueno, y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 50:50 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,150 g, 95 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1063 (M + H)$^+$

[0671]

Paso 12: Compuesto 42-12

A una solución del compuesto obtenido en el paso 11 (0,150 g, 0,141 mmol) en N,N-dimetilformamida (3,5 mL), se añadió una solución acuosa de acetato de litio (1,52 M, 0,088 mL) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se añadió agua a la solución de reacción, la cual se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo:metanol = 100:0 (v/v) a 95:5 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,135 g, 96 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 907 $(M + H)^+$

[0672]

Paso 13: Compuesto 42-13

A una solución del compuesto obtenido en el paso 12 (0,048 g, 0,053 mmol) y al compuesto obtenido en el paso 9 (0,034 g, 0,048 mmol) en N,N-dimetilformamida (0,5 mL), se añadió carbonato de cesio (0,011 g, 0,034 mmol) ) a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una agitación durante 1,5 horas, y luego a 45 °C durante 5 horas. A la solución de reacción, se añadió tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) y el resultante se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con tampón fosfato 0,1 N (pH 7,0) y se secó sobre sulfato de sodio, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo:metanol = 100:0 (v/v) a 97:3 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,038 g, 52 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1534 $(M + H)^+$

[0673]

Paso 14: Compuesto 42-14

El compuesto obtenido en el paso 13 (0,038 g, 0,247 mmol), se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3. Después la solución de reacción se sometió a

separación de líquidos, el solvente orgánico se removió por destilación a presión reducida, y el compuesto resultante se utilizó directamente para la reacción posterior.
MS (APCI, ESI) m/z: 1420 $(M + H)^+$

[0674]

Paso 15: Compuesto 42-15

A una solución del compuesto obtenido en el paso 14 (0,034 g, 0,140 mmol) en dimetilformamida (2 mL), se agregaron pirrolidina (0,048 mL, 0,574 mmol) y tetraquis (trifenilfosfina) paladio (0) (0,0054 g, 0,0046 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 50 minutos. Después de que el solvente orgánico se destiló a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en sulfóxido de dimetilo y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (columna: Develosil Combi-RP-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.), 20 mm ×100 mm: una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 %: solución de acetonitrilo ácido fórmico al 0,1 % = 79,2:20,8 a 51,4: 48,6, velocidad de flujo: 25 mL/min, temperatura: 25°C) para proporcionar el compuesto deseado (0,020 g, 72 %).
MS (APCI, ESI) m/z: 1168 $(M + H)^+$

[0675]

Paso 16: Compuesto 42-16

A una solución del compuesto obtenido en el paso 15 (0,002 g, 0,0017 mmol) en dimetilformamida (0,5 mL), se añadieron trietilamina (0,007 ml, 0,051 mmol) y 1-{[4-(11,12-didehidrobenzo[b, f]azocina-5 (6H)-il) 4-oxobutanoil]oxopirrolidin-2,5-diona disponible en el mercado (0,083 g, 0,0205 mmol), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 horas. El solvente orgánico se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en sulfóxido de dimetilo y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (columna: Develosil Combi-RP-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.), 20 mm ×100 mm: una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 %: solución de acetonitrilo ácido fórmico al 0,1 % = 62,5:37,5 a 34,7: 65,3, velocidad de flujo: 25 mL/min, temperatura: 25 °C) y cromatografía en columna de gel de sílice [capa orgánica para distribución

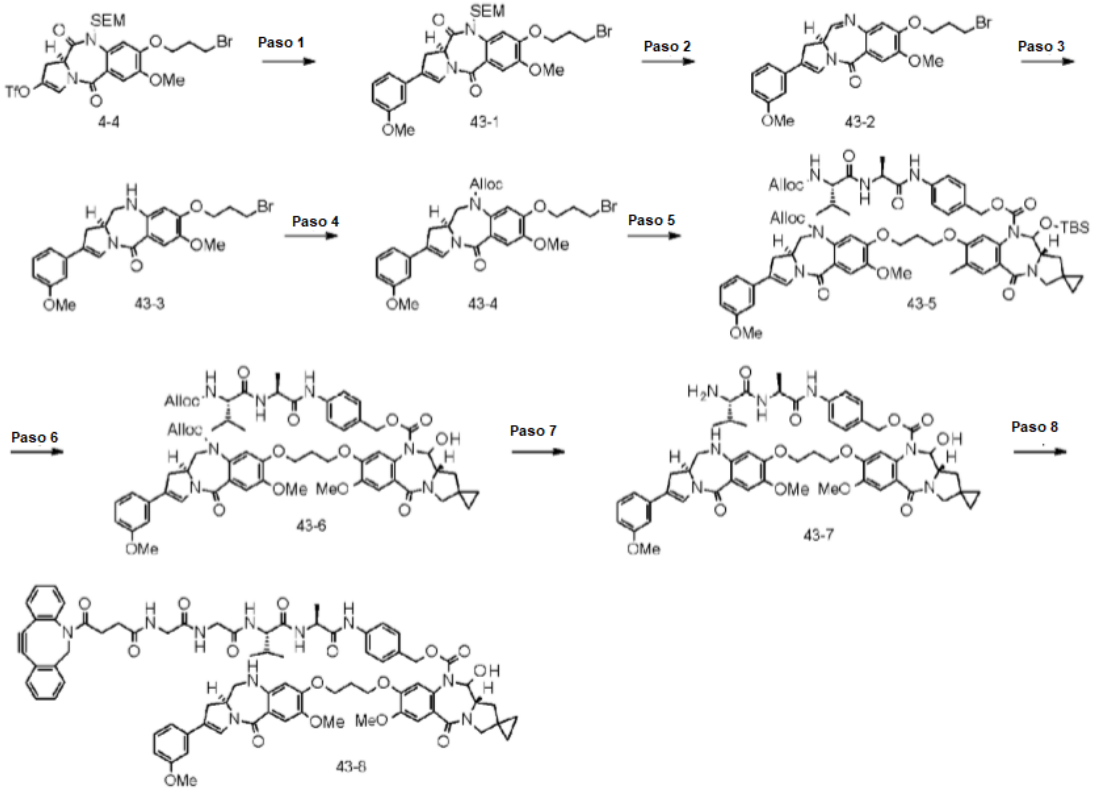
con cloroformo - cloroformo:metanol:agua = 7:3:1 (v/v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,033 g, 14 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1455 $(M + H)^+$

[0676]

Ejemplo 43: Enlazador de fármacos 41

[Fórmula 167]




Paso 1: Compuesto 43-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (0,72 g, 1,09 mmol) y el ácido 4-metilfenilborónico (0,332 g, 2,18 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,526 g, 78 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 619 [$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 617 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$]

[0677]

Paso 2: Compuesto 43-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,526 g, 0,851 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,195 g, 49 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 473 [$^{81}$Br,(M + H) $^{+}$], 471 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$]

[0678]

Paso 3: Compuesto 43-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,195 g, 0,414 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,195 g, cuantitativo). MS(APCI, ESI) m/z: 475 [$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 473 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0679]

Paso 4: Compuesto 43-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,413 g) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,106 g, 46 %). MS(APCI, ESI) m/z: 559 [$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 557 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0680]

Paso 5: Compuesto 43-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,069 g, 0,124 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,128 g, 80 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1284 (M + H)$^{+}$

[0681]

Paso 6: Compuesto 43-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,128 g, 0,099 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,105 g, 90%).

MS (APCI, ESI) m/z: 1170 (M + H)$^{+}$

[0682]

Paso 7: Compuesto 43-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,105 g, 0,089 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,072 g, 80 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1002 (M + H)$^{+}$

[0683]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(3-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi) metil]fenil}-L-alaninamida

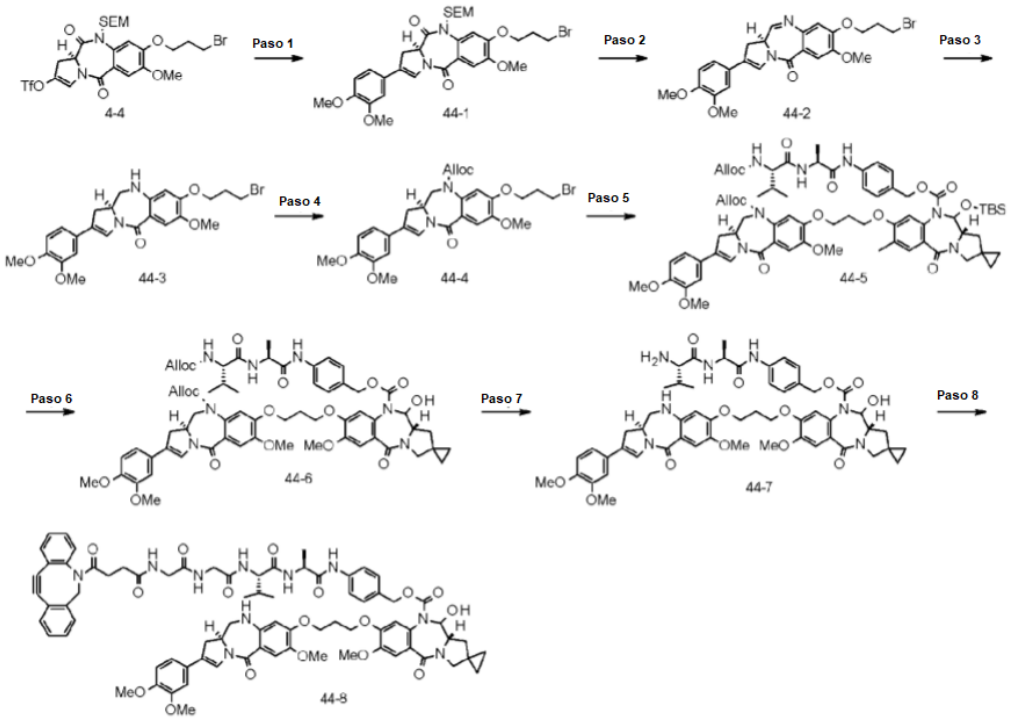
El compuesto obtenido en el paso 7 (0,072 g, 0,072 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,053 g, 52 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1403 $(M + H)^+$

[0684]

Ejemplo 44: Enlazador de fármacos 42

[Fórmula 168]




Paso 1: Compuesto 44-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 4 (0,68 g, 1,03 mmol) y el ácido 3,4-dimetoxifenilborónico (0,375 g, 2,06 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,506 g, 75 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 649 [$^{81}$Br,(M + H) $^{+}$], 647 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$]

[0685]

Paso 2: Compuesto 44-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,506 g, 0,781 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,199 g, 50 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 503 [$^{81}$Br,(M + H) $^{+}$], 501 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$]

[0686]

Paso 3: Compuesto 44-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,169 g, 0,337 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,231 g, cuantitativo). MS(APCI, ESI) m/z: 505 [$^{81}$Br,(M + H)$^{+}$], 503 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$].

[0687]

Paso 4: Compuesto 44-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,337 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,170 g, 86 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 589 [$^{81}$Br,(M + H) $^{+}$], 587 [$^{79}$Br,(M + H)$^{+}$]

[0688]

Paso 5: Compuesto 44-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,076 g, 0,136 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,116 g, 71 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1314 (M + H)$^{+}$

[0689]

Paso 6: Compuesto 44-6

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,116 g, 0,088 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,108 g, cuantitativo).

MS (APCI, ESI) m/z: 1200 $(M + H)^+$

[0690]

Paso 7: Compuesto 44-7

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,090 mol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,066 g, 71 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1032 $(M + H)^+$

[0691]

Paso 8: N-[4-(11,12-didehidrodibenzo[b,f]azocin-5(6H)-il)-4-oxobutanoil] glicilglicil-L-valil-N-{4-[({[((11a'S)-8'-(3-{[(11aS)-2-(3-4-dimetoxifenil)-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina-8-il]oxi}propoxi)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-il]carbonil}oxi)metil] fenil}-L-alaninamida

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,066 g, 0,064 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 13 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,053 g, 58 %).

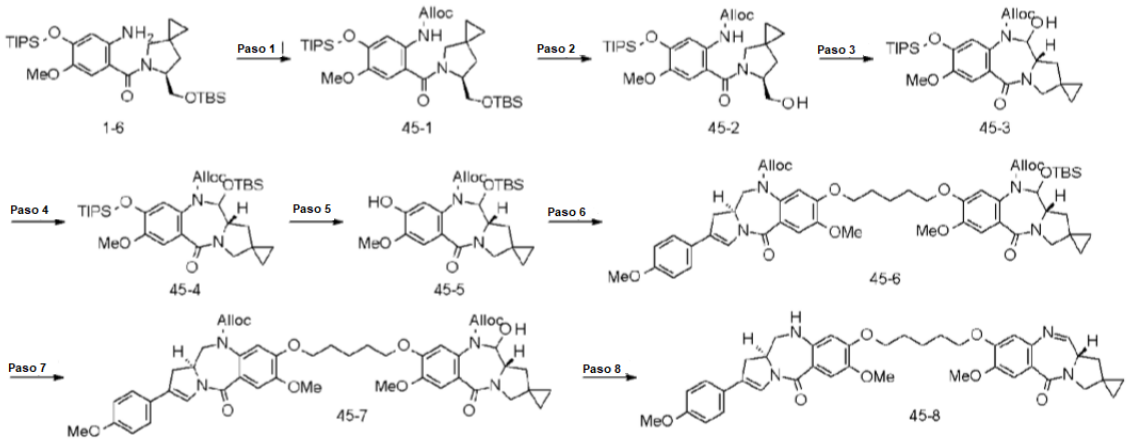
MS (APCI, ESI) m/z: 1434 $(M + H)^+$

[0692]

[Síntesis del fármaco D]

Ejemplo 45: Fármaco 1

[Fórmula 169]




Paso 1: Prop-2-en-1-il(2-{[(6S)-6-({[terc-butil(dimetil)silil]oxi}metil)-5-azaspiro[2.4] hept-5-il]carbonilo}-4-metoxi-5-{[tri (propan-2- il)silil]oxi} fenil)carbamato

El compuesto obtenido en el paso 5 del Ejemplo 1 (4,59 g, 8,15 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (4,86 g, 92 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,97(1H,s),7,77(1H,s),6,77(1H,s),5,97-5,94(1H,m),5,39-5,21(2H,m),4,67-4,59(3H,m),4,00-3,98(1H,m),3,74-3,66(5H,m),3,05-3,03(1H,m),2,30-2,28(1H,m),1,72-1,70(1H,m),1,30-1,27(3H,m),1,11-1,05(18H,m),0,99-0,91(9H,m),0,61-0,53(4H,m),0,10-0,06(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 647 $(M + H)^+$

[0693]

Paso 2: Prop-2-en-1-il(2-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4] hept-5-il]carbonilo}-4-metoxi-5-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}fenil)carbamato

El compuesto obtenido en el paso 1 (4,86 g, 7,51 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (3,42 g, 86 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:8,52(1H,s),7,71(1H,s),6,77(1H,s),6,00-5,94(1H,m),5,35-5,27(2H,m),4,65-4,64(3H,m),4,33-4,31(1H,m),3,82-3,77(5H,m),3,68-3,66(1H,m),3,15-3,13(1H,m),1,89-1,86(2H,m),1,30-1,26(3H,m),1,14-1,10(18H,m),0,66-0,51(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 533 $(M + H)^+$

[0694]

Paso 3: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-11', 11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10' (5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 2 (6,68 g, 12,5 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (6,44 g, 97 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,20(1H,s),6,69(1H,s),5,89-5,78(2H,m),5,18-5,15(2H,m),4,62-4,60(1H,m),4,49-4,47(1H,m),3,85(3H,s),3,74-3,71(1H,m),3,59-3,57(1H,m),3,33-3,30(2H,m),2,43-2,40(1H,m),1,76-1,73(1H,m),1,28-1,20(3H,m),1,09-1,07(18H,m),0,74-0,65(4H,m). MS

(APCI, ESI) m/z: 531 $(M + H)^+$ [0695]

Paso 4: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-5'-oxo-8'-{[tri(propan-2- il)silil]oxi}-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 3 (3,24 g, 6,10 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (3,86 g, 98 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,20(1H,s),6,67(1H,s),6,01-5,98(1H,m),5,79-5,73(1H,m),5,14-5,10(2H,m),4,64-4,61(1H,m),4,37-4,34(1H,m),3,86(3H,s),3,72-3,69(1H,m),3,52-3,50(1H,m),3,29-3,26(1H,m),2,38-2,34(1H,m),1,55-1,51(1H,m),1,28-1,24(3H,m),1,15-1,07(18H,m),0,81-0,66(13H,m),0,21(3H,s),0,18(3H,s).

MS (APCI, ESI) m/z: 645 $(M + H)^+$

[0696]

Paso 5: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-8'-hidroxi-7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 4 (4,49 g, 6,96 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (3,24 g, 95 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,25(1H,s),6,73(1H,s),6,02-6,00(1H,m),5,91(1H,s),5,77-5,75(1H,m),5,11-5,09(2H,m),4,64-4,62(1H,m),4,41-4,40(1H,m),3,95(3H,s),3,72-3,70(1H,m),3,54-3,53(1H,m),3,29-3,26(1H,m),2,36-2,34(1H,m),1,56-1,54(1H,m),0,79-0,67(13H,m),0,21(3H,s),0,20(3H,s).

MS (APCI, ESI) m/z: 489 $(M + H)^+$

[0697]

Paso 6: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-{[5-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonilo]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina-8-il}oxi)pentil]oxi}-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,080 g, 0,164 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,160 g, 98 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,44-7,42(3H,m),7,12-7,10(2H,m),7,05-7,03(1H,m),6,92-6,90(2H,m),6,61-6,59(1H,m),5,87-5,81(3H,m),5,10-5,07(4H,m),4,66-4,55(3H,m),4,43-4,39(2H,m),4,21-3,94(5H,m),3,83(3H,s),3,81(3H,s),3,76(3H,s),3,65-3,62(1H,m),3,56-3,54(1H,m),3,42-3,39(1H,m),3,22-3,14(2H,m),2,77-2,73(1H,m),2,42-2,33(1H,m),1,81-1,79(4H,m),1,55-1,44(3H,m),0,82(9H,s),0,72-0,53(4H,m),0,19(3H,s),0,17(3H,s).

MS (APCI, ESI) m/z: 993 $(M + H)^+$

[0698]

Paso 7: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-{[5 ({(11aS)-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro- 1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il}oxi)pentil]oxi}-5'-oxo-11',11a'-dihidro- 1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 6 (160 mg, 0,161 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (141 mg, cuantitativo).

$^{1}$H-RMN(DMSO-D$_6$)δ:7,44-7,42(3H,m),7,08-7,06(3H,m),6,92-6,90(2H,m),6,82-6,79(1H,m),6,56-6,54(1H,m),5,77-5,74(3H,m),5,09(4H,s),4,58-4,55(3H,m),4,43-4,41(2H,m),4,16-4,01(5H,m),3,81-3,81(6H,m),3,76(3H,s),3,64(1H,s),3,56-3,53(1H,m),3,42-3,38(1H,m),3,25-3,13(2H,m),2,74-2,70(1H,m),2,37-2,34(1H,m),1,82-1,79(4H,m),1,59-1,56(3H,m),0,66-0,62(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 879 $(M + H)^+$

[0699]

Paso 8: (11a'S)-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}pentil)oxi]-1',11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 7 (141 mg, 0,161 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (109,8 mg, 99 %).

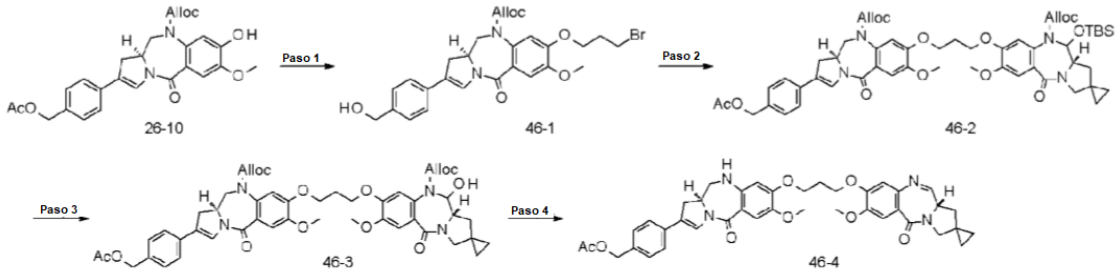
$^{1}$H-RMN(DMSO-D$_6$)δ:7,92-7,91(1H,m),7,45(1H,s),7,39-7,37(2H,m),7,33(1H,s),7,29(1H,s),6,92-6,89(2H,m),6,85(1H,s),6,56-6,54(1H,m),6,31(1H,s),4,19-4,12(2H,m),4,05-3,99(1H,m),3,95-3,93(2H,m),3,82-3,79(4H,m),3,76(3H,s),3,66(3H,s),3,52-3,46(3H,m),3,30-3,21(2H,m),2,78-2,74(1H,m),2,45-2,42(1H,m),2,06-2,05(1H,m),1,89-1,82(4H,m),1,60-1,58(2H,m),0.80-0,63(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 693 $(M + H)^+$

[0700]

Ejemplo 46: Fármaco 2

[Fórmula 170]




Paso 1: Compuesto 46-1

El compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 26 (0,246 g, 0,514 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,122 g, 40 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 601[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 599 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0701]

Paso 2: Compuesto 46-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,122 g, 0,204 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 45 para proporcionar el compuesto deseado (0,176 g, 86 %).

[0702]

Paso 3: Compuesto 46-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,0870 g, 0,0864 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0660 g, 86 %). MS (APCI, ESI) m/z: 892 $(M + H)^+$

[0703]

Paso 4: 4-[(11aS)-7-metoxi-8-(3-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',11a'dihydro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-8'-il]oxi}propoxi)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-2-il]acetato de bencilo

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,0660 g, 0,0793 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0444 g, 85 %).

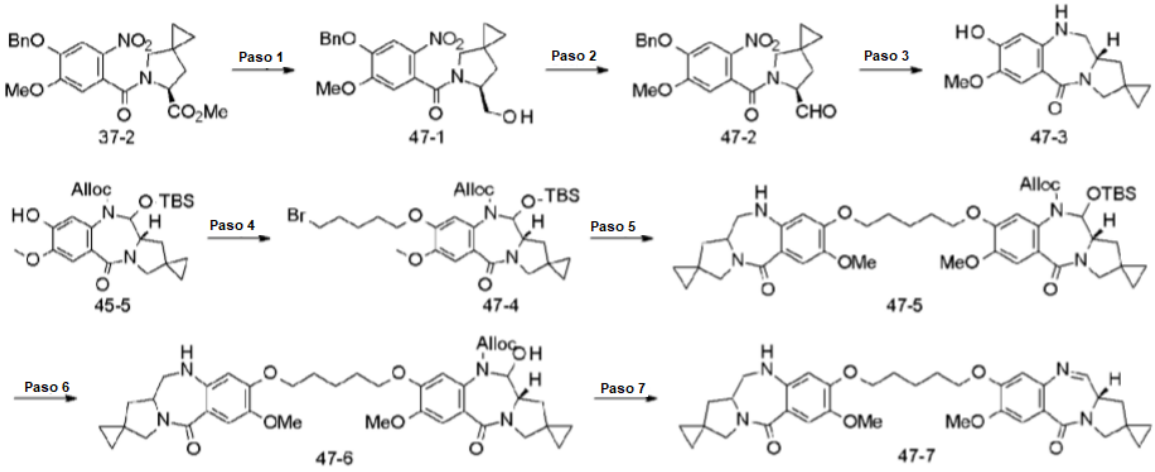
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,80-7,79(1H,m),7,66-7,65(1H,m),7,52-7,50(2H,m),7,39-7,33(5H,m),6,86-6,85(1H,m),6,14-6,13(1H,m),5,09(2H,s),4,32-4,23(6H,m),3,95-3,95(3H,m),3,85-3,82(4H,m),3,71-3,68(2H,m),3,55-3,49(3H,m),3,42-3,33(1H,m),2,79-2,72(1H,m),2,54-2,50(1H,m),2,40-2,36(2H,m),2,02-1,98(1H,m),1,26-1,24(1H,m),0,76-0,72(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 706 $(M + H)^+$

[0704]

Ejemplo 47: Fármaco 3

[Fórmula 171]




Paso 1: [4-(bencil)-5-metoxi-2-nitrofenil][(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4]hept-5-il]metanona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 37 (6,49 g, 14,7 mmol) en tetrahidrofurano (147 mL), se añadió borohidruro de litio (0,642 g, 29,5 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A la solución de reacción, se añadió ácido clorhídrico 1 N, que se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica obtenida se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio, y luego se destiló a presión reducida. El residuo resultante (6,94 g, cuantitativo) se utilizó para la etapa posterior sin purificación.

MS (APCI, ESI) m/z: 413 $(M + H)^+$

[0705]

Paso 2: (6S)-5-[4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoil]-5-azaspiro[2.4]heptano-6-carbaldehído

El compuesto obtenido en el paso 1 (4,50 g, 11,0 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (1,94 g, 43 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 411 $(M + H)^+$

[0706]

Paso 3: (11a'S)-8'-hidroxi-7'-metoxi-1',10',11',11a'-tetrahidro-5'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

A una solución mixta del compuesto obtenido en el paso 2 (1,94 g, 4,73 mmol) en tetrahidrofurano (25 mL), acetato de etilo (25 mL) y metanol (25 ml), 5 % de carbono de paladio (contenido de humedad: 54 %, 1,0 g) bajo la atmósfera de nitrógeno, y la solución de reacción se agitó luego bajo la atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 22 horas. Después de filtrar la solución de reacción a través de un Celite, el filtrado se destiló a presión. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 80:20 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (1,20 g, 93 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7.55(1H,s),6,16(1H,s),5,86(1H,s),4,08-4,02(2H,m),3,86(3H,s),3,72-3,69(1H,m),3,57-3,37(3H,m),2,04-2,01(1H,m),1,78-1,75(1H,m),0,79-0,53(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 275 $(M + H)^+$

[0707]

Paso 4: Prop-2-en-1-il (11a'S)-8'-[(5-bromopentil)oxi]-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi} -7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 3 del Ejemplo 45 (0,300 g, 0,614 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,388 g, 99 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,24(1H,s),6,60(1H,s),6,02-5,98(1H,m),5,80-5,75(1H,m),5,11-5,06(2H,m),4,68-4,64(1H,m),4,40-4,38(1H,m),4,02-3,98(2H,m),3,92(3H,s),3,72-3,69(1H,m),3,54-3,52(1H,m),3,46-3,41(2H,m),3,29-3,26(1H,m),2,38-2,34(1H,m),1,94-1,87(4H,m),1,65-1,62(2H,m),1,55-1,55(1H,m),0,86(9H,s),0,75-0,67(4H,m),0,24-0,22(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 639[$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 637 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$].

[0708]

Paso 5: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-

pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina]-10' (5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,203 g, 0,318 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto obtenido en el paso 3 (0,131 g, 0,478 mmol) de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0880 g, 33 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 831 $(M + H)^+$

[0709]

Paso 6: Prop-2-en-1-il (11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5',10',11',11a'-tetrahidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-8'-il] oxi}pentil)oxi] -5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-10'(5'H)carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,0880 g, 0,106 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0500 g, 66 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 717 $(M + H)^+$

[0710]

Paso 7: (11a'S)-7'-metoxi-8'-[(5-{[(11a'S)-7'-metoxi-5'-oxo-5', 11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1, 2'-pirrolo [2,1-c] [1,4]benzodiacepina]-8'-il]oxi}pentil)oxi]-1',10',11', 11a'-tetrahidro-5'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 6 (0,0500 g, 0,0698 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0330 g, 77 %).

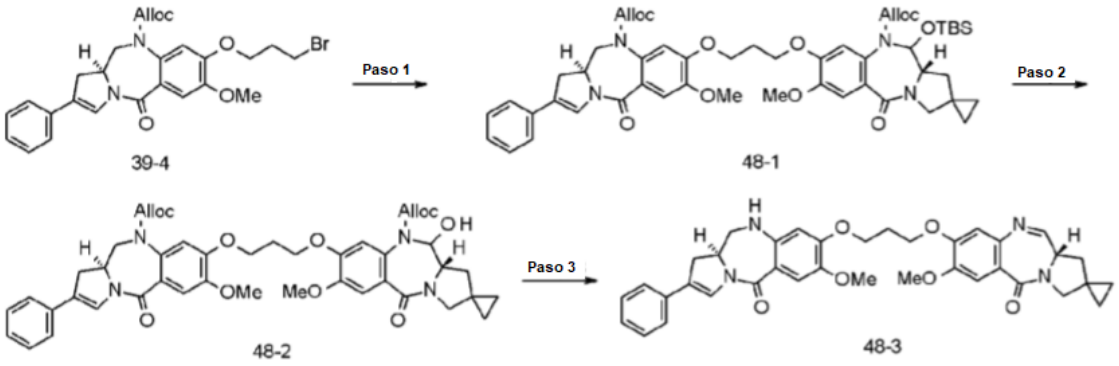
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,80(1H,m),7,58(1H,s),7,52(1H,s),6,81(1H,s),6,05(1H,s),4,17-3,97(5H,m),3,94(3H,s),3,87(1H,m),3,84(3H,s),3,72-3,68(3H,m),3,51-3,45(5H,m),2,54-2,51(1H,m),2,03-1,90(6H,m),1,75-1,68(2H,m),0,66(8H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 615 $(M + H)^+$

[0711]

Ejemplo 48: Fármaco 4

[Fórmula 172]




Paso 1: Compuesto 48-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 39 (0,165 g, 0,313 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 45 para proporcionar el compuesto deseado (0,270 g, 92 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 935 $(M + H)^+$

[0712]

Paso 2: Compuesto 48-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,270 g, 0,289 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,208 g, 88 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 821 $(M + H)^+$

[0713]

Paso 3: (11a'S)-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-5-oxo-2-fenil-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-1',11a'-dihidro- -5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

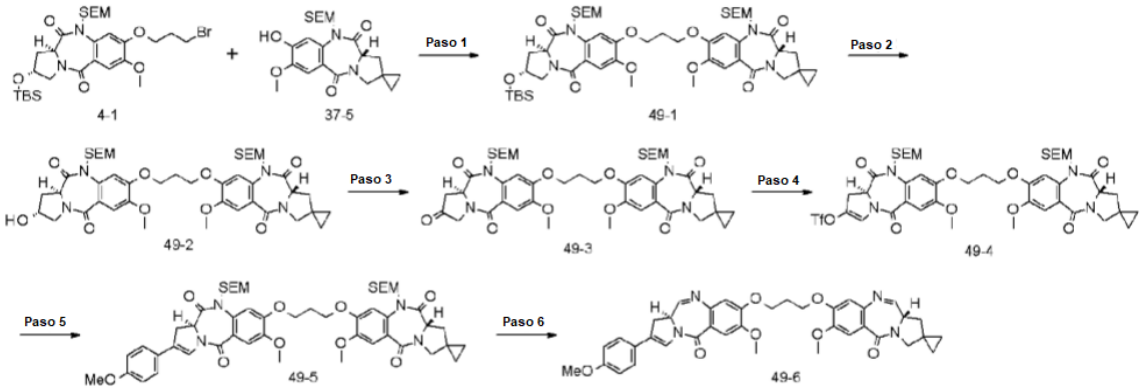
El compuesto obtenido en el paso 2 (0,208 g, 0,253 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,130 g, 80 %).

MS(APCI, ESI) m/z: 635 $(M + H)^+$

[0714]

Ejemplo 49: Fármaco 5

[Fórmula 173]




Paso 1: Compuesto 49-1

El compuesto 4-1 (8,52 g, 13,2 mmol) y el compuesto 37-5 (6,09 g, 14,5 mmol) obtenidos en el paso 4 del Ejemplo 37, se utilizaron y se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (10,7 g, 83 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,36(1H,s),7,34(1H,s),7,26(1H,s),7,23(1H,s),5,53-5,46(2H,m),4,72-4,69(2H,m),4,59-4,55(1H,m),4,28-4,20(6H,m),3,90-3,89(6H,m),3,80-3,63(6H,m),3,57-3,54(1H,m),3,42-3,39(1H,m),2,87-2,82(1H,m),2,47-2,40(3H,m),2,24-2,20(1H,m),2,04-1,99(1H,m),0,99-0,95(4H,m),0,87(9H,s),0,70-0,63(4H,m),0,09(6H,s),0,02-0,00(18H,m).

[0715]

Paso 2: Compuesto 49-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (10,7 g, 10,9 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 3 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (9,45 g, 100 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,36-7,34(2H,m),7,26(1H,s),7,23(1H,s),5,53-5,47(2H,m),4,72-4,64(3H,m),4,30-4,20(6H,m),3,89(6H,s),3,85-3,62(7H,m),3,42-3,39(1H,m),2,99-2,93(1H,m),2,47-2,39(3H,m),2,25-2,07(3H,m),0,99-0,95(4H,m),0,89-0,86(1H,m),0.70-0,64(3H,m),0,02-0,00(18H,m).

[0716]

Paso 3: Compuesto 49-3

El compuesto obtenido en el paso 2 (9,45 g, 10,9 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 4 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (9,14 g, 97 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,37(1H,s),7,33(1H,s),7,27-7,26(2H,m),5,54-5,51(2H,m),4,77-4,70(2H,m),4,64-4,61(1H,m),4,31-4,20(6H,m),3,91(3H,s),3,90(3H,s),3,80-3,65(6H,m),3,60-3,55(1H,m),3,42-3,39(1H,m),2,83-2,75(1H,m),2,47-2,41(3H,m),2,25-2,20(1H,m),1,00-0,95(4H,m),0,92-0,85(1H,m),0,71-0,63(3H,m),0,02-0,01(18H,m).

[0717]

Paso 4: Compuesto 49-4

El compuesto obtenido en el paso 3 (4,27 g, 4,94 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 5 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (3,16 g, 64 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,37(1H,s),7,32(1H,s),7,27-7,25(2H,m),7,15-7,14(1H,m),5,53-5,50(2H,m),4,77-4,70(2H,m),4,64-4,60(1H,m),4,30-4,20(6H,m),3,90(6H,s),3,81-3,66(4H,m),3,42-3,39(1H,m),3,18-3,13(1H,m),2,47-2,41(3H,m),2,25-2,20(1H,m),0,99-0,94(4H,m),0,89-0,86(1H,m),0,69-0,64(3H,m),0,02-0,00(18H,m).

[0718]

Paso 5: Compuesto 49-5

El compuesto obtenido en el paso 4 (1,00 g, 1,00 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,900 g, 94 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,69-7,65(1H,m),7,57-7,53(1H,m),7,49-7,45(1H,m),7,39-7,36(4H,m),7,33(1H,s),7,27(1H,s),6,90-6,88(2H,m),5,53-5,50(2H,m),4,77-4,71(2H,m),4,62-4,59(1H,m),4,30-4,20(5H,m),3,91(3H,s),3,91(3H,s),3,82(3H,s),3,80-3,65(4H,m),3,42-3,39(1H,m),3,16-3,10(1H,m),2,47-2,41(3H,m),2,25-2,20(1H,m),1,00-0,96(4H,m),0,89-0,85(1H,m),0,70-0,63(3H,m),0,02-0,01(18H,m).

[0719]

Paso 6: (11a'S)-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo- 5,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-1',11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

A una solución del compuesto obtenido en el paso 5 (0,900 g, 0,942 mmol) en THF (30 mL) y etanol (3 mL), se añadió lentamente borohidruro de litio (0,456 g 18,8 mmol) a 0 °C. Después la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas,

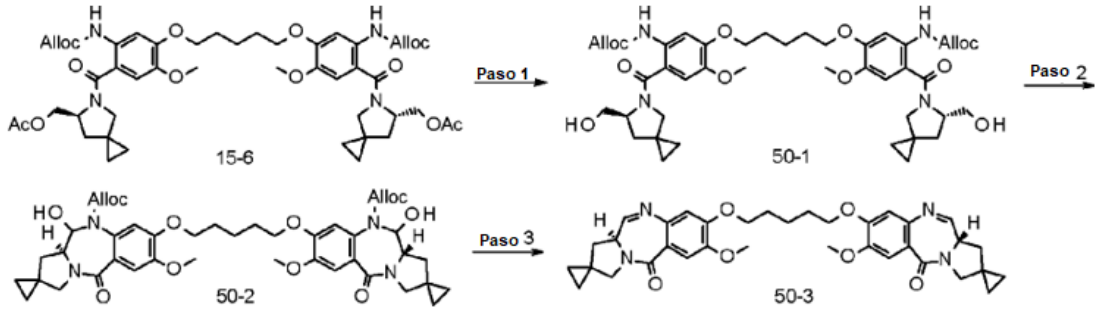
se añadió agua a la mezcla de reacción, la cual se agitó vigorosamente. La mezcla de reacción se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se destiló a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en diclorometano (10 mL), etanol (20 mL) y agua (5 mL). Se añadió gel de sílice (15,0 g) a la mezcla de reacción, la cual se agitó bajo la atmósfera de nitrógeno durante 3 días. La mezcla de reacción se filtró y la capa orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración seguida de destilación a presión reducida, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [cloroformo:metanol = 100:0 (v/v) a 92:8 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,308 g, 49 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 663 $(M + H)^+$

[0720]

Ejemplo 50: Fármaco 6

[Fórmula 174]




Paso 1: Di-2-propen-1-il{1,5-pentanediilbis[oxi(6-{[(6S)-6-(hidroximetil)-5-azaspiro[2.4] hept-5-il]carbonil}-4-metoxibenceno-3,1-diil)]}biscarbamato

La forma de bisaliloxicarbonilo 15-6 (0,460 g, 0,508 mmol), obtenida en el paso 5 del Ejemplo 15, se disolvió en metanol (10 mL) y carbonato de potasio (351 mg, 2,54 mmol) y el resultante se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. A esto, se añadieron 50 mL de un cloruro de amonio acuoso saturado, y el resultante se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El resultante se destiló a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado (0,421 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:9,19(2H,s),7,22(2H,s),6,89(2H,s),5,97-5,92(2H,m),5,33(2H,m),5,22(2H,m),4,81(2H,m),4,55(4H,m),4,26(2H,s),3,96(4H,m),3,74(6H,s),3,62(2H,m),3,56(2H,s),3,37(2H,m),3,11(2H,m),1,88-1,78(8H,m),1,56-1,54(2H,m),0,54-0,43(8H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 821 $(M + H)^+$

[0721]

Paso 2: Diprop-2-en-1-il(11a'S,11a''''S)-8',8''-[pentan-1,5-diilbis(oxi)]bis (11'-hidroxi-7'-metoxi -5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo [2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato)

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,421 g, 0,513 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 15 para proporcionar el compuesto deseado (0,326 g, 78 %).

$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,07(2H,s),6,80(2H,s),6,55(2H,m),5,84-5,81(2H,m),5,75(2H,m),5,09-5,05(4H,m),4,62(2H,mz),4,40(2H,m),3,98(4H,m),3,81(6H,s),3,54(2H,m),3,43-3,37(2H,m),3,14(2H,m),2,35(2H,m),1,81-1,79(4H,m),1,59-1,56(4H,m),0,70-0,59(8H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 817 $(M + H)^+$

[0722]

Paso 3: (11a'S,11a''''S)-8',8''-[(1,5-pentanodiilbis(oxi)]bis(7'-metoxi-1',11a'-dihidro-5'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona)

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,326 g, 0,399 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,208 g, 85 %).

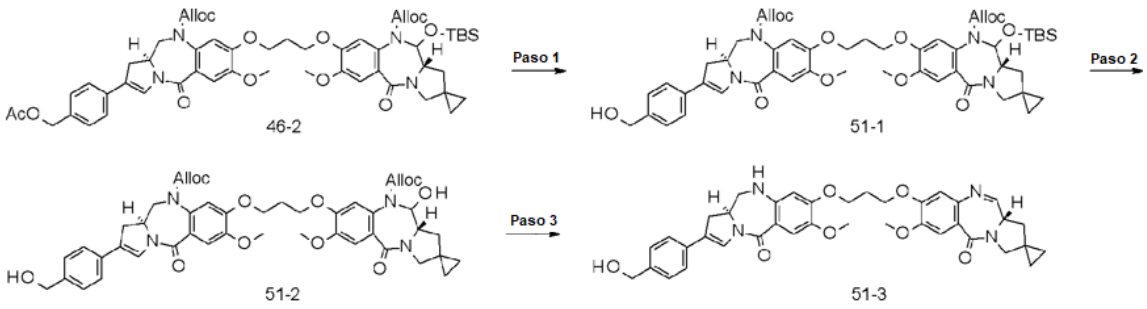
$^1$H-RMN(DMSO-$D_6$)δ:7,91(2H,m),7,32(2H,s),6,84(2H,s),4,11(2H,m),4,06(2H,m),3,82(6H,s),3,51-3,31(6H,m),2,43(2H,m),2,05(2H,m),1,82-1,80(4H,m),1,60-1,58(2H,m),0,79-0,77(2H,m),0,68-0,64(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 613 $(M + H)^+$

[0723]

Ejemplo 51: Fármaco 7

[Fórmula 175]




[0724]

Paso 1: Compuesto 51-1

El compuesto 46-2 (0,0870 g, 0,0863 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 27 para proporcionar el compuesto deseado (0,0660 mg, 79 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,50(1H,s),7,36-7,34(4H,m),7,27-7,24(2H,m),6,80(1H,s),6,64(1H,s),6,03(1H,m),5,80-5,74(2H,m),5,10-5,06(3H,m),4,70(2H,m),4,67-4,60(2H,m),4,41-4,37(3H,m),4,23-4,20(6H,m),3,90(3H,s),3,89(3H,s),3,72(1H,m),3,65-3,62(1H,m),3,51(1H,m),3,34-3,26(2H,m),2,75-2,71(1H,m),2,39-2,35(3H,m),1,74(1H,m),1,56-1,52(1H,m),0,85(9H,s),0,80-0,62(4H,m),0,22(3H,s),0,21(3H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 965 $(M + H)^+$

[0725]

Paso 2: Compuesto 51-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,0660 g, 0,0683 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0590 g, cuantitativo).

MS(APCI, ESI) m/z: 851 $(M + H)^+$

[0726]

Paso 3: (11a'S)-8'-[3-({(11aS)-2-[4-(hidroximetil)fenil]-7-metoxi-5-oxo- 5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il}oxi)propoxi]-7'- metoxi-1',11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,0590 g, 0,0693 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,0290 g, 63 %).

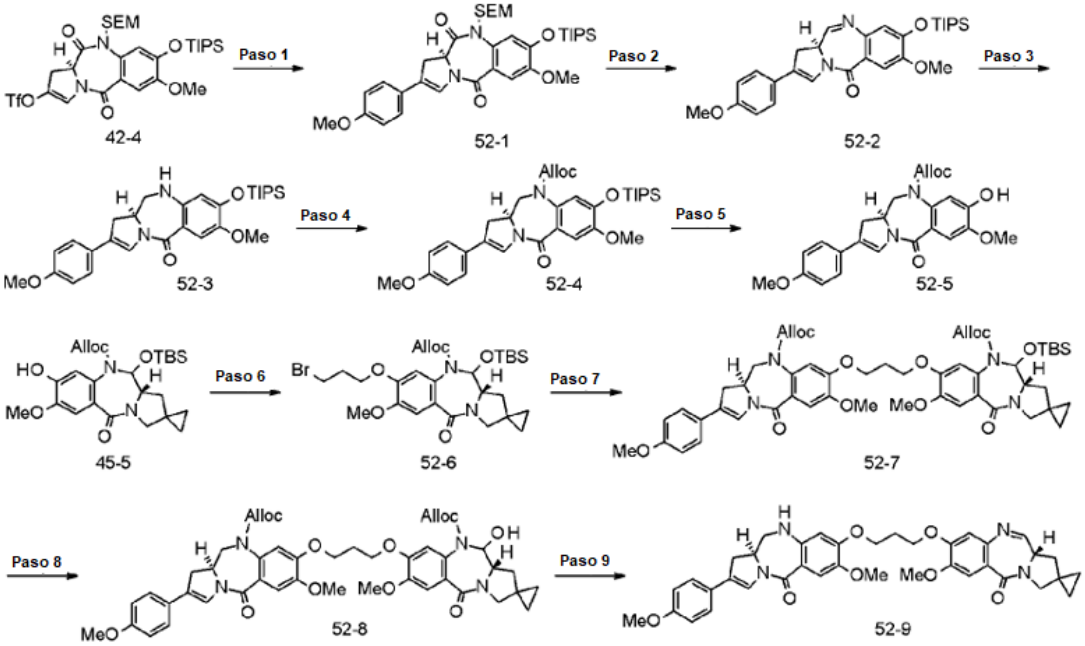
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,80-7,79(1H,m),7,64-7,64(1H,m),7,52-7,51(2H,m),7,36-7,33(4H,m),6,85(1H,m),6,14(1H,m),4,69(2H,m),4,30-4,26(6H,m),3,95-3,95(3H,m),3,86-3,84(3H,m),3,67(1H,m),3,56-3,54(2H,m),3,50-3,48(2H,m),3,39-3,30(1H,m),2,80-2,73(1H,m),2,52(1H,m),2,41-2,39(2H,m),2,00(1H,m),1,73-1,72(1H,m),0,76-0,70(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 665 $(M + H)^+$

[0727]

Ejemplo 52: Fármaco 8

[Fórmula 176]



Paso 1: (11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-10-{[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-8-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-5,11(10H,11aH)-diona

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 42 (0,519 g, 0,747 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,511 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,41-7,31(5H,m),6,91-6,85(2H,m),5,52(1H,m),4,64(1H,m),4,57(1H,m),3,97-3,90(1H,m),3,88(3H,s),3,83(3H,s),3,75-3,56(2H,m),3,19-3,09(1H,m),1,36-1,23(3H,m),1,11(18H,m),1,02-0,97(2H,m),0,03(9H,s).

MS(APCI, ESI) m/z: 653 [$(M + H)^+$]

[0728]

Paso 2: (11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-8-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-1,11a-dihidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,178 g, 0,272 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 7 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,094 g, 68 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,87(1H,m),7,51(1H,s),7,41-7,39(1H,m),7,36-7,33(2H,m),6,93-6,89(2H,m),6,86(1H,s),4,44-4,38(1H,m),3,90(3H,s),3,83(3H,s),3,61-3,53(1H,m),3,41-3,34(1H,m),1,33-1,25(3H,m),1,11-1,06(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 507$(M + H)^+$

[0729]

Paso 3: (11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-8-{[tri(propan-2-il)silil]oxi}-1,10,11,11a-tetrahidro-5H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-5-ona

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,063 g, 0,124 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 8 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,046 g, 72 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,53-7,48(2H,m),7,33-7,29(2H,m),6,90-6,86(2H,m),6,13-6,11(1H,m),4,36-4,29(1H,m),4,11(1H,s),3,82(3H,s),3,79(3H,s),3,59-3,50(2H,m),3,40-3,31(1H,m),2,78-2,68(1H,m),1,31-1,20(3H,m),1,13-1,02(18H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 509 $(M + H)^+$

[0730]

Paso 4: Prop-2-en-1-il(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-8-{[tri (propan-2- il) silil] oxi}-11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 3 (0,046 g, 0,090 mmol) se utilizó y se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 9 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,03 g, 56 %).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,39-7,36(1H,m),7,31-7,28(2H,m),7,22(1H,s),6,90-6,86(3H,m),6,75-6,72(1H,m),5,82-5,69(1H,m),5,18-5,08(2H,m),4,59-4,52(1H,m),4,48-4,39(1H,m),4,39-4,29(1H,m),4,23-4,12(1H,m),3,86(3H,s),3,82(3H,s),3,64-3,58(1H,m),3,32-3,25(1H,m),2,73-2,65(1H,m),1,30-1,20(2H,m),1,12-1,06(18H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 593 $(M + H)^+$

[0731]

Paso 5: Prop-2-en-1-il(11aS)-8-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo- 11,11a-dihidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-10(5H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 4 (0,030 g, 0,050 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 1 para proporcionar el compuesto deseado (0,015 g, 0,034 mmol).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,39-7,25(4H,m),6,92-6,78(3H,m),6,03-5,92(1H,m),5,86-5,68(1H,m),5,20-5,07(2H,m),4,66-4,57(1H,m),4,52-4,40(1H,m),4,40-4,27(1H,m),4,27-4,16(1H,m),3,95(3H,s),3,82(3H,s),3,66-3,59(1H,m),3,32-3,21(1H,m),2,74-2,64(1H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 437 $(M + H)^+$

[0732]

Paso 6: Prop-2-en-1-il(11a'S)-8'-(3-bromopropoxi)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi} -7'-metoxi-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 5 del Ejemplo 45 (0,131 g, 0,268 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 4 para proporcionar el compuesto deseado (0,086 g, 52 %).

$^{1}$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,24(1H,s),6,65(1H,s),6,02(1H,m),5,87-5,71(1H,m),5,15-5,04(2H,m),4,72-4,62(1H,m),4,44-4,32(1H,m),4,23-4,07(3H,m),3,92(3H,s),3,77-3,47(4H,m),3,28(1H,m),2,37(3H,m),1,57-1,52(1H,m),0,86(9H,s),0,82-0,57(4H,m),0,21(6H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 611 [$^{81}$Br,$(M + H)^+$], 609 [$^{79}$Br,$(M + H)^+$]

[0733]

Paso 7: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-{[terc-butil(dimetil)silil]oxi}-7'-metoxi-8'-[3-({(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonilo]-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4] benzodiacepina-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro-1'H-espiro [ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 5 (0,015 g, 0,034 mmol) y el compuesto obtenido en el paso 6 (0,030 g, 0,048 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 10 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,032 g, 96 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 965 $(M + H)^+$

[0734]

Paso 8: Prop-2-en-1-il(11a'S)-11'-hidroxi-7'-metoxi-8'-[3({(11aS)-7-metoxi-2- (4-metoxifenil)-5-oxo-10-[(prop-2-en-1-iloxi)carbonil]-5,10,11,11a-tetrahidro- 1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il}oxi)propoxi]-5'-oxo-11',11a'-dihidro -1'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-10'(5'H)-carboxilato

El compuesto obtenido en el paso 7 (0,031 g, 0,032 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,026 g, 95 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 851 $(M + H)^+$

[0735]

Paso 9: (11a'S)-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-1', 11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 8 (0,026 g, 0,030 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,018 g, 88 %).

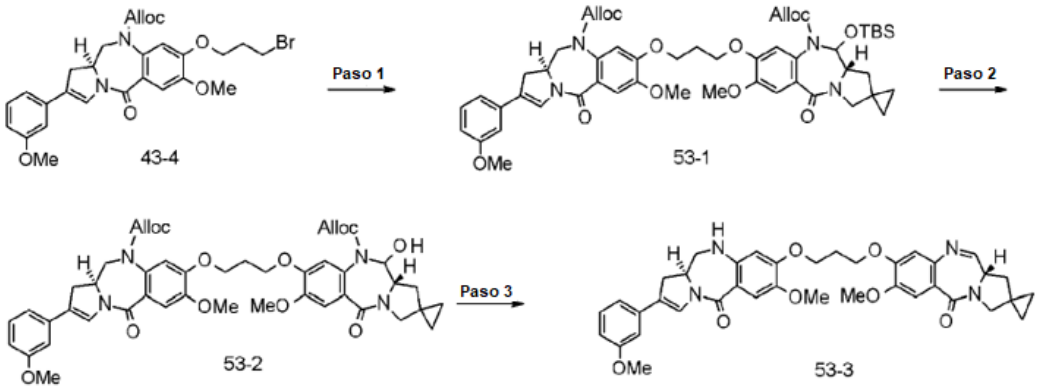
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,80(1H,m),7,54-7,51(3H,m),7,33-7,29(2H,m),6,91-6,85(3H,m),6,14(1H,s),4,35-4,17(6H,m),3,95(3H,s),3,85(3H,s),3,82(3H,s),3,76-3,25(5H,m),2,79-2,69(1H,m),2,52(1H,m),2,45-2,35(1H,m),2,03-1,96(1H,m),1,28-1,23(2H,m),0,78-0,69(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 665 $(M + H)^+$

[0736]

Ejemplo 53: Fármaco 9

[Fórmula 177]




Paso 1: Compuesto 53-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 43 (0,027 g, 0,048 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 45 para proporcionar el compuesto deseado (0,037 g, 79 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 965 $(M + H)^+$

[0737]

Paso 2: Compuesto 53-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,037 g, 0,038 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (35 mg, cuantitativo). MS(APCI, ESI) m/z: 851 $[(M + H)^+]$

[0738]

Paso 3: (11a'S)-7'-metoxi-8'-(3-{[(11aS)-7-metoxi-2-(3-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-1', 11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,038 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 6 al 8 del Ejemplo 45 para proporcionar el compuesto deseado (25 mg, 99 %).

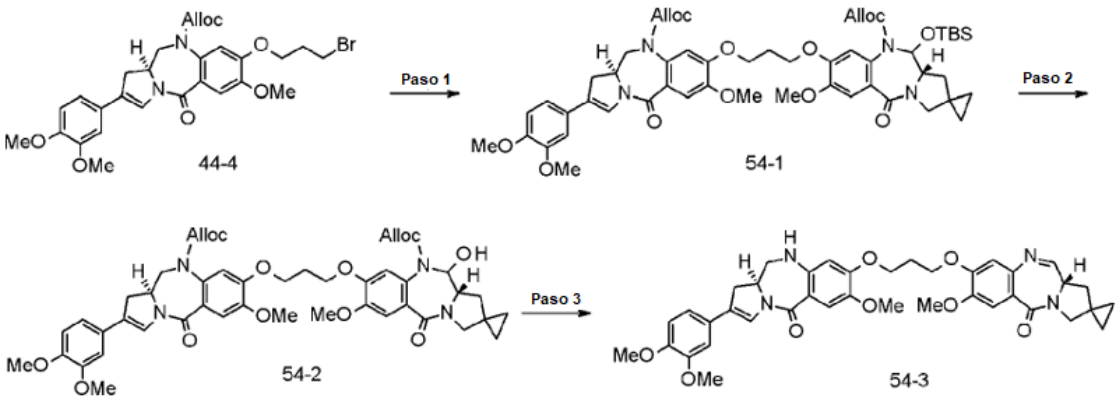
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,81-7,78(1H,m),7,65-7,62(1 H,m),7,53-7,49(2H,m),7,24(1H,m),6,96(1H,m),6,91-6,88(1H,m),6,85(1H,m),6,78(1H,m),6,14(1H,m),4,41-4,18(5H,m),3,97-3,92(3H,m),3,88-3,84(3H,m),3,83(3H,s),3,76-3,25(5H,m),2,78-2,71(1H,m),2,52(1H,m),2,45-2,35(2H,m),2,03-1,96(1H,m),1,29-1,21(2H,m),0,78-0,69(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 664 $(M + H)^+$

[0739]

Ejemplo 54: Fármaco 10

[Fórmula 178]




Paso 1: Compuesto 54-1

El compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 44 (0,027 g, 0,046 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 6 del Ejemplo 45 para proporcionar el compuesto deseado (0,037 g, 81 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 995 $(M + H)^+$

[0740]

Paso 2: Compuesto 54-2

El compuesto obtenido en el paso 1 (0,037 g, 0,037 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 11 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,034 g, cuantitativo).

MS (APCI, ESI) m/z: 881 $(M + H)^+$

[0741]

Paso 3: (11a'S)-8'-(3-{[(11aS)-2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina-8-il]oxi}propoxi)-7'-metoxi-1', 11a'-dihidro-5'H-espiro[ciclopropano-1,2'-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiacepina]-5'-ona

El compuesto obtenido en el paso 2 (0,037 mmol) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el compuesto deseado (0,027 g, cuantitativo).

$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,81-7,78(1H,m),7,55-7,49(3H,m),6,99-6,96(1H,m),6,87-6,82(3H,m),6,14(1H,m),4,41-3,28(22H,m),2,77-2,71(1H,m),2,57-2,48(1H,m),2,45-2,34(2H,m),2,04-1,96(1H,m),1,43-1,11(2H,m),0,79-0,67(4H,m).

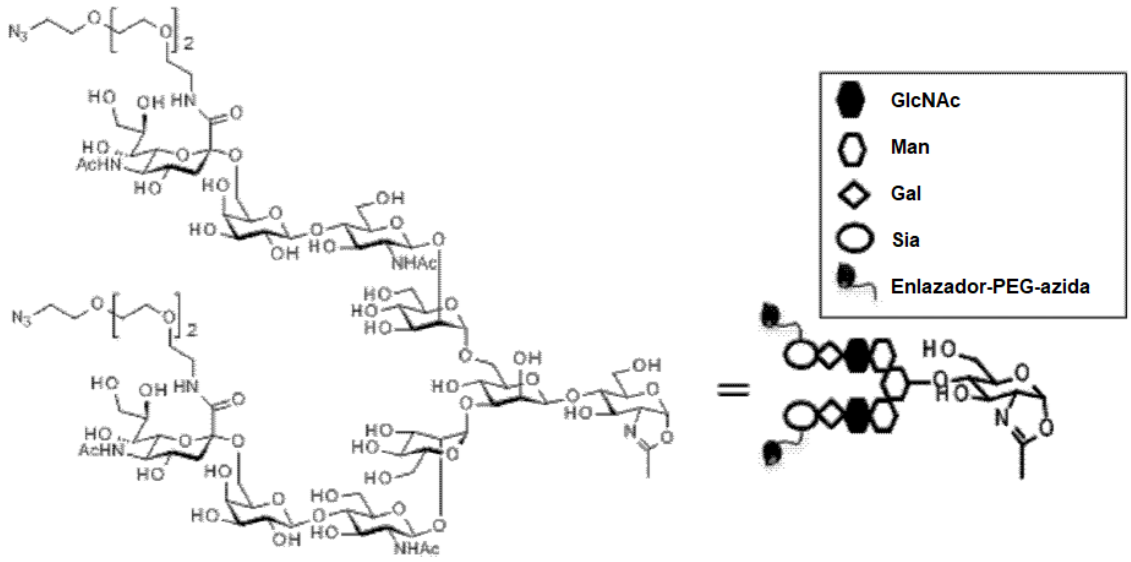
MS (APCI, ESI) m/z: 695 $(M + H)^+$

[0742]

[Síntesis de donador de glicano]

Ejemplo 55: $[N_3$-PEG (3)$]_2$-SG (10)-Ox

[Fórmula 179]




(En la figura, el diagrama esquemático a la derecha de la fórmula estructural representa la estructura correspondiente en el diagrama esquemático de un intermedio que tiene una estructura de un enlazador a la que se ha introducido un grupo azida tal y como se representa en la fórmula de reacción del Ejemplo 58).

[0743]

Paso 1: $[N_3\text{-PEG (3)}]_2\text{-SG (10)}$

En un tubo de muestreo de 5 mL (Ina-Optica Co., Ltd), se añadieron una solución acuosa (0,5 mL) de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina (0,096 mL, 0,485 mmol) y disialooctasacárido (50 mg, 0.24 mmol), y el resultante se agitó durante 1 hora y luego se liofilizó. En el tubo de muestreo de 5 mL, después de la liofilización, se añadieron una solución de N,N-dimetilformamida (0.6 mL) de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il) -N,N,N',N'- tetrametiluronio (92 mg , 0,24 mmol) y diisopropiletilamina (0,042 mL, 0,24 mmol), seguido de agitación a 37 °C durante 4 horas. Después de completar la reacción, la solución de reacción se transfirió a un tubo de centrífuga (50 mL) en el que se había añadido con anticipación éter etílico (20 mL).La materia sólida se precipitó utilizando una centrífuga pequeña (Hitachi Koki Co., Ltd., CF16RX) y se eliminó el sobrenadante. Se añadió éter dietílico (20 mL) y el resultante se decantó. Posteriormente, se añadió acetonitrilo (20 mL) y el resultante se decantó, y luego se secó a presión reducida para proporcionar un

producto crudo. La materia sólida resultante se disolvió en una cantidad apropiada de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,2 % y se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 ( producida por GL Sciences, Inc.). Se recogieron las fracciones que contenían el compuesto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado (42 mg).

[0744]

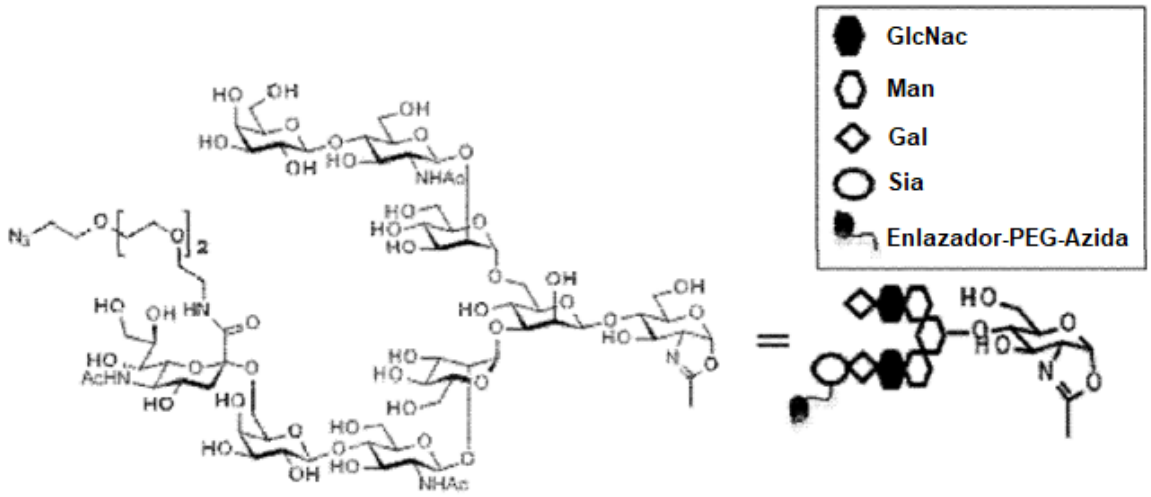
Paso 2: $[N_3\text{-PEG (3)}]_2$-SG (10)-Ox

En un tubo de muestreo de 5 mL (producido por Ina-Optica Co., Ltd) se añadieron el compuesto sintetizado en el paso 1 (40 mg) y una solución acuosa (200 μL) de cloruro de 2-cloro-1,3-dimetil-1H-bencimidazol-3-ium (producido por FUSHIMI Pharmaceutical Co., Ltd. 17,9 mg, 0,083 mmol). A la solución de reacción después de enfriarse con hielo, se añadió una solución acuosa (200 μl) de fosfato tripotásico (52,6 mg, 0,25 mmol), seguido de agitación con enfriamiento con hielo durante 2 horas. La solución de reacción resultante se sometió a ultrafiltración con un Amicon Ultra (Ultracel 30K, producido por Merck Millipore) para eliminar la materia sólida. La solución filtrada se purificó por cromatografía de filtración en gel. El aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), la columna utilizada fue una desaladora HiPrep 26/10 (producida por GE Healthcare), la fase móvil utilizada fue una solución acuosa de 0,03 % - $NH_3$, y la tasa de flujo fue de 10 mL/min y el volumen de la fracción fue de 10 mL. Se recogieron las fracciones que contenían el compuesto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución, a estas se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido de sodio (33 μL, 0,033 mmol), y el resultante se liofilizó para proporcionar el compuesto deseado (34 mg).

[0745]

Ejemplo 56: $[N_3\text{-PEG (3)}]$-MSG1-Ox

[Fórmula 180]




(En la figura, el diagrama esquemático a la derecha de la fórmula estructural representa la estructura correspondiente en el diagrama esquemático de un intermedio que tiene una estructura de un enlazador a la que se ha introducido un grupo azida tal y como se representa en la fórmula de reacción de los Ejemplo 60, 61, 62, 63, 64, 65 y 66).

[0746]

Paso 1: (MSG1-)Asn

El producto disponible en el mercado libre de monosialo-Asn (1S2G/1G2S-10NC-Asn, producido por GlyTech, Inc.) (denominado "(MSG-) Asn") (500 mg) se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa en las condiciones siguientes para separar en (MSG1-)Asn eluido como el primer pico principal (tiempo de retención: alrededor de 15 a 19 min) y (MSG2-)Asn eluido como el segundo pico principal (tiempo de retención: alrededor de 21 a 26 min). El eluyente utilizado fue una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 %, el aparato utilizado fue un sistema preparativo de activación ELS-PDA (producido por JASCO Corporation), la columna utilizada fue un Inertsil ODS-3 (10 um, 30 ϕ ×250 mm, producido por GL Sciences, Inc.), y la tasa de flujo fue de 30 ml/min. Las fracciones pertenecientes al primer pico detectado por UV (210 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado (238 mg).

[0747]

Paso 2: MSG1

El compuesto obtenido en el paso 1 (229 mg) se disolvió en una solución tampón de fosfato 200 mM (pH de 6,25) (1145 μL), a la que se añadió una solución acuosa (100 μL) de EndoM (producida por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/mL)), y el resultante se incubó a 35 °C durante 6 días. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se sometió a ultrafiltración con un VIVASPIN 15R (membrana Hydrosart, 30K, 6,000 g), y la solución filtrada obtenida se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente utilizado fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un sistema preparatorio de activación ELS-PDA (producido por JASCO Corporation), y la columna utilizada fue un Inertsil ODS-3 (producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el compuesto deseado detectado por UV (210 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado (117 mg).

[0748]

Paso 3: [$N_3$-PEG (3)]-MSG1

El compuesto sintetizado en el paso 2 (169 mg) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 55 para producir el compuesto deseado (94,2 mg).

[0749]

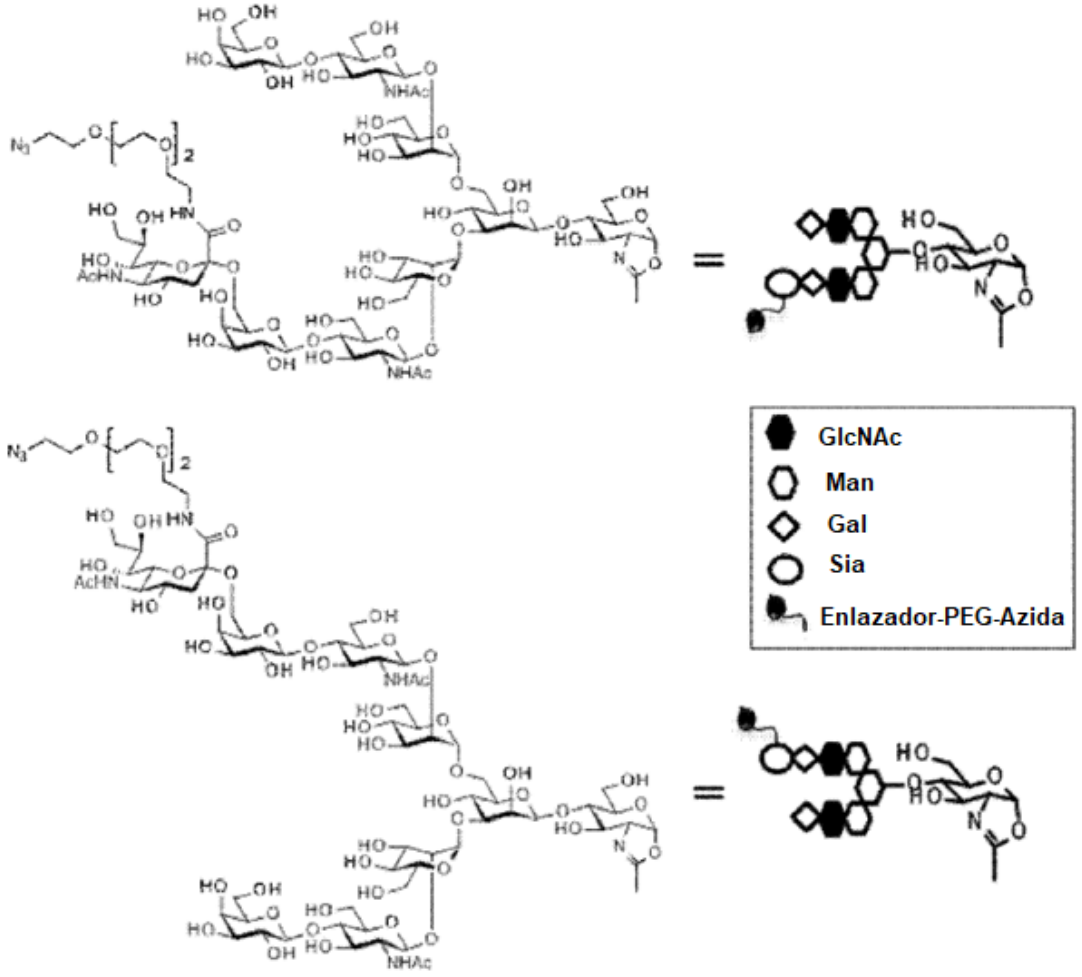
Paso 4 [$N_3$-PEG (3)]-MSG1-Ox

El compuesto (100 mg) sintetizado en el paso 3 se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 55 para producir el compuesto deseado (89 mg).

[0750]

Ejemplo 57: [$N_3$-PEG (3)]-MSG-Ox

[Fórmula 181]




(En la figura, el diagrama esquemático a la derecha de la fórmula estructural representa la estructura correspondiente en el diagrama esquemático de un intermedio que tiene una estructura de un enlazador a la que se ha introducido un grupo azida tal y como se representa en la fórmula de reacción del Ejemplo 59).

[0751]

Paso 1: Preparación de (MSG-)Asn

El producto comercialmente disponible 1S2G/1G2S-10NC-Asn-Fmoc (producido por GlyTech, Inc.) (denominado "Fmoc-(MSG-)Asn") (1000 mg) se disolvió en etanol/agua (1/1) (10 mL), a la que se añadió una solución acuosa 1 N de hidróxido de sodio (1,75 mL, 4 equivalentes), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas.Una vez completada la reacción, la solución de reacción se sometió a ultrafiltración con un Amicon Ultra (30K, producido por Millipore Corporation) para

eliminar la materia sólida, y se añadió ácido clorhídrico 1 N (832 μL, 1,9 equivalentes) a la solución filtrada obtenida. El solvente se eliminó con el evaporador de alta velocidad V-10 (producido por Biotage). Se añadió acetonitrilo al mismo, y el disolvente se eliminó con el evaporador de alta velocidad V-10 (producido por Biotage), y el resultante luego se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 ( producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el compuesto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron. Esto se disolvió nuevamente en agua pura, y una tira de prueba de pH indicó que la solución era ácida. Por lo tanto, se añadió a esto amoniaco acuoso al 18 % (150 μl) y se confirmó con una tira de prueba de pH que la solución se había vuelto básica, y la solución se liofilizó nuevamente. El compuesto deseado obtenido (840 mg) se usó directamente para la reacción posterior.

[0752]

Paso 2: Síntesis de MSG

El compuesto obtenido en el paso 1 (840 mg) se disolvió en una solución tampón de fosfato 200 mM (pH de 6,25) (6000 μL), a la que se añadió una solución acuosa (200 μL) de EndoM (producida por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/mL)), y el resultante se incubó a 28 °C durante 6 horas. Ya que la reacción no se había completado, se agregó una solución acuosa (50 μL) de EndoM (producida por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 1 U/mL), y el resultante se incubó a 28 °C durante 2 horas, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente hasta la finalización de la reacción. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se sometió a ultrafiltración con un Amicon Ultra (30K, producido por Millipore Corporation). Se añadió ácido trifluoroacético (80 μl) a la solución filtrada obtenida, la cual se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente era una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato

utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 (producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el compuesto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron. Esto fue disuelto nuevamente en agua pura para eliminar el ácido trifluoroacetico residual, y así se obtuvo el compuesto deseado (618 mg) como sólido incoloro.

ESI-MS: Calculado para $C_{66}H_{110}N_4O_{49}$: $[M+H]^+$ 1743,62, encontrado 1743,63

[0753]

Paso 3: Síntesis del [$N_3$- PEG (3)]-MSG Ox

De acuerdo con el procedimiento del paso 1 del Ejemplo 55 utilizando el compuesto obtenido en el paso 2 (120 mg), se obtuvo el compuesto deseado (88,6 mg).

ESI-MS: Calculado para $C_{73}H_{124}N_8O_{51}$: $[M+2H]^{2+}$ 965,37, Encontrado 965,37

[0754]

Paso 4 Síntesis del [$N_3$- PEG (3)]-MSG-Ox-

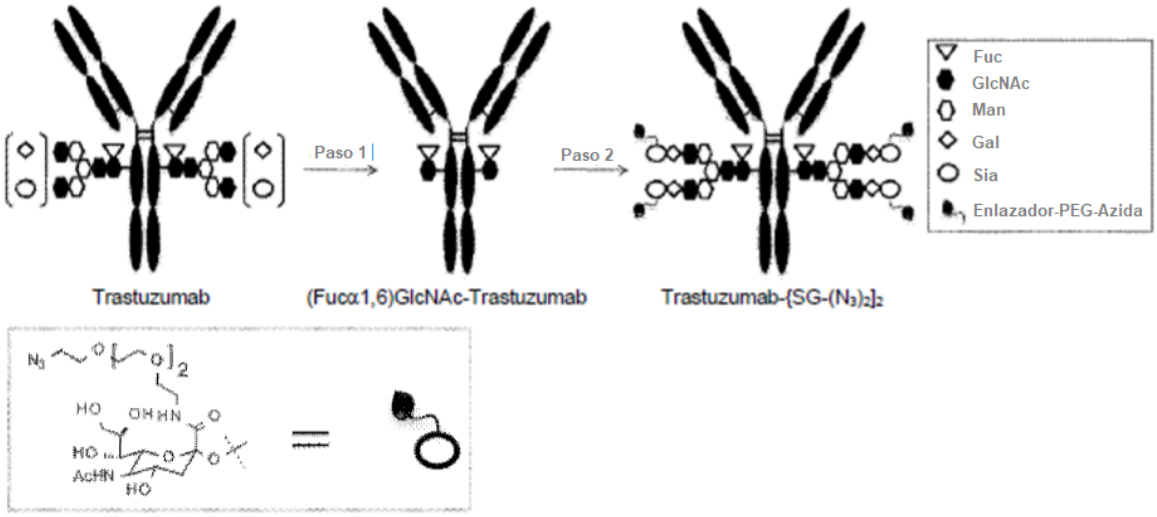
De acuerdo con el procedimiento del paso 2 del Ejemplo 55 utilizando el compuesto obtenido en el paso 4 (100 mg), se obtuvo el compuesto deseado (88 mg).

[0755]

[Preparación del anticuerpo con glicano remodelado]

Ejemplo 58: Remodelación de la cadena de azúcar 1 (T-SG)

[Fórmula 182]




(Esta fórmula representa una estructura de enlace en la que se ha introducido un grupo azida en un ácido siálico en el extremo no reductor de un glicano N297 de tipo SG. En el Ejemplo 58, las estructuras de enlace de los intermedios formados al introducir un grupo azida en un glicano N297 son todos iguales a la estructura representada por la fórmula).

[0756]

Paso 1: Preparación de Trastuzumab (Fucα 1,6) GlcNAc

La solución de trastuzumab de 22 mg/mL (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) (45,5 mL) preparada en el Ejemplo de referencia 3 se redujo a la mitad y de acuerdo con la operación común C, el intercambio de tampón a tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0 ) se realizó dos veces por separado. A la solución resultante de trastuzumab 28, 1 mg/mL (18 mL) y 28,0 mg/ml (18 mL) de se añadieron (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)), 1,26 mL y 1,27 mL de solución EndoS de tipo silvestre (2,0 mg / ml, PBS) respectivamente, y las soluciones se incubaron a 37 °C durante 4 horas. El progreso de la reacción fue verificado por la estación de electroforesis Experion (producida por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Una vez completada la reacción, la purificación por cromatografía de afinidad y la purificación con una columna de hidroxiapatita se realizaron de acuerdo con los siguientes métodos.

(1) Purificación por cromatografía de afinidad.

Aparato de purificación: AKTA pure150 (producido por GE Healthcare)

Columna: HiTrap rProtein A FF (5 mL) (producida por GE
Healthcare) Tasa de flujo: 5 mL/min (1,25 mL/min en carga)
Cada solución de reacción obtenida anteriormente se purificó en múltiples operaciones separadas. Dos columnas se unieron en una columna y, al conectarse a la columna, la solución de reacción se añadió a la parte superior de la columna, y 2 CV de tampón de unión (tampón fosfato 20 mM (pH de 6,0)) se hicieron fluir a 1,25 mL/min y 5 CV de esta se hizo fluir adicionalmente a 5 mL/min. En el lavado intermedio, se hicieron fluir 15 CV de solución de lavado (tampón fosfato 20 mM (pH de 7,0), solución de cloruro de sodio 0,5 M). En elución, se hicieron fluir 6 CV de tampón de elución (tampón de inmunización ImmunoPure IgG, producido por Pierce). El eluato se neutralizó inmediatamente con tampón Tris 1 M (pH de 9,0). Las fracciones detectadas por UV (280 nm) durante la elución se verificaron utilizando el espectrofotómetro de micro volumen Xpose (producido por Trinean NV) y una estación de electroforesis Experion (producida por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se sometieron a intercambio de tampón a tampón fosfato 5 mM/solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM (pH de 6,8) usando la operación común C.

(2) Purificación por cromatografía de hidroxiapatita

Aparato de purificación: AKTA avant25 (producido por GE Healthcare):
Columna Cartucho Bio-Scale Mini CHT Tipo I (5 mL) (producido por Bio-
Rad Laboratories, Inc.)
Velocidad de flujo: 5 mL/min (1,25 mL/min en carga)
Dos columnas se unieron en una columna, y la solución obtenida en
(1) se purificó en múltiples operaciones separadas. La solución se añadió a la parte superior de la columna y se hicieron fluir 2 CV de solución A (tampón fosfato 5 mM, solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM (pH 6,8)) a 1,25 mL/min y 3 CV de esta. se hizo fluir adicionalmente a 5 mL/min. Posteriormente, la elución se realizó con la solución A y la solución B (tampón fosfato 5 mM/solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 50 mM (pH de 6,8), solución 2 M de cloruro de sodio).

Las condiciones de elución fueron solución A:solución B = 100:0 a 0:100 (15 CV). Además, se hicieron fluir 5 CV de solución de lavado (tampón fosfato 500 mM (pH 6,5)).

Las fracciones que contenían el compuesto deseado se sometieron a intercambio de tampón utilizando la operación común C para proporcionar una solución Trastuzumab (Fucα1,6)GlcNAc de 25,5 mg/μl (tampón de fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (35 mL).

[0757]

Paso 2: Preparación de Trastuzumab[SG-$(N_3)_2$]$_2$

A la solución Trastuzumab (Fucα1,6)GlcNAc de 23,9 mg/ml (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenida en el paso 1 (3,37 mL), se añadieron una solución (0,258 mL) del compuesto sintetizado en el paso 2 de Ejemplo 55 (12,9 mg) en tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0) y

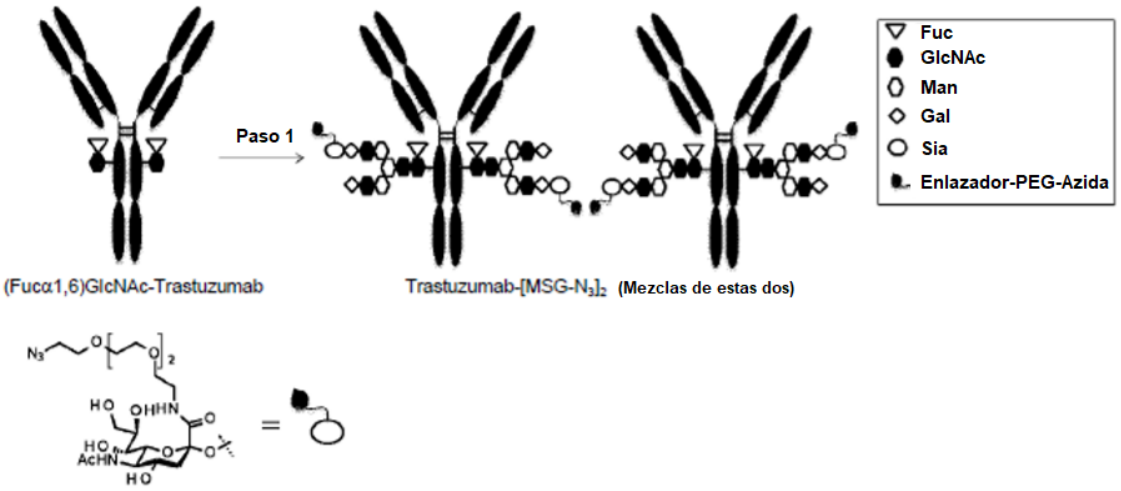
4,90 mg/mL de solución EndoS D233Q/Q303L (PBS) (0,328 mL), y el resultante se incubó a 30 °C durante 4,5 horas. Estas operaciones se realizaron en dos lotes. El progreso de la reacción se verificó utilizando una estación de electroforesis Experion (producida por Bio-Rad Laboratories, Inc.). Una vez completada la reacción, se llevó a cabo la purificación por cromatografía de afinidad y la purificación por cromatografía de hidroxiapatita como en el paso 1, y las fracciones que contenían el compuesto deseado se sometieron a un intercambio de tampón a solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) utilizando la operación común C para proporcionar una solución de 10,0 mg/mL de Trastuzumab [SG-$(N_3)_2$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (15,5 ml).

[0758]

Ejemplo 59: Remodelación de la cadena de azúcar 2

(T-MSG)

[Fórmula 183]




(Esta fórmula representa una estructura de enlace en la que se ha introducido un grupo azida en un ácido siálico en el extremo no reductor de un glicano N297 de tipo MSG. En el Ejemplo 59, las estructuras de enlace de los intermedios formados al introducir un grupo azida en un glicano N297 son todos iguales a la estructura representada por la fórmula).

[0759]

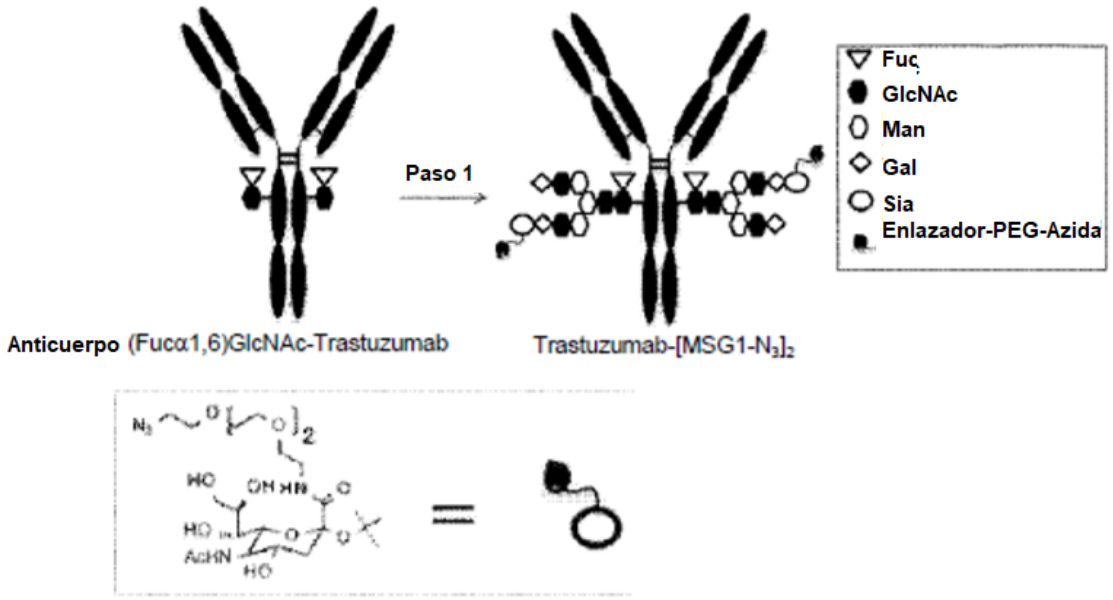
Paso 1: Trastuzumab[MSG-$(N_3)_2$]$_2$

Las siguientes operaciones se realizaron en cinco lotes. El compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 58 (20 mg/mL, 15,0 mL) se utilizó con el compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 57 (25,5 mg) como donante de glicano, y se incubó a 30 °C durante 3 horas, y se realizaron las operaciones igual que en el paso 2 del Ejemplo 59. Con los cinco lotes combinados, se obtuvo una solución de Trastuzumab [MSG-$N_3$]$_2$ de 14,4 mg/ml (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (93,5 ml).

[0760]

Ejemplo 60: Remodelación de la cadena de azúcar

3 (T- MSG1) [Fórmula 184]



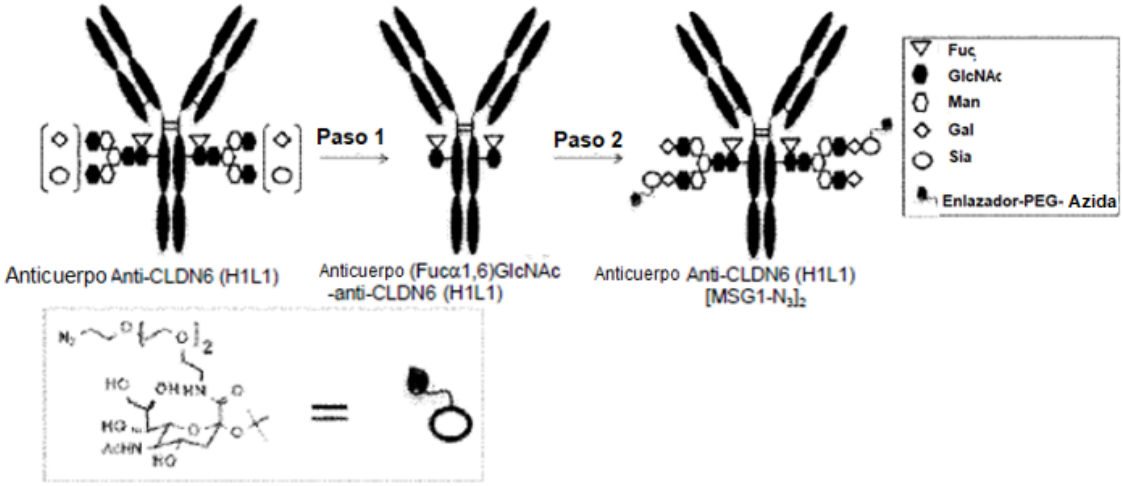

(Esta fórmula representa una estructura de enlace en la que se ha introducido un grupo azida en un ácido siálico en el extremo no reductor de un glicano N297 de tipo MSG1. En el Ejemplo 60, las estructuras de enlace de los intermedios formados al introducir un grupo azida en un glicano N297 son todos iguales a la estructura representada por la fórmula. Lo mismo es cierto para los ejemplos 61 al 66.)

Paso 1: Trastuzumab[MSG1-$N_3$]$_2$

Las siguientes operaciones se realizaron en dos lotes. El compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 58 (25,5 mL, 7,8 mL) se utilizó con el compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 56 (25,5 mg) como donante de glicano, y se incubó a 30 °C durante 3 horas, y se realizaron las operaciones igual que en el paso 2 del Ejemplo 59. Con los dos lotes combinados, se obtuvo una solución de Trastuzumab [MSG1-$N_3$]$_2$ de 10,6 mg/ml (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (31 mL).

[0761]

Ejemplo 61: Remodelación de la cadena de azúcar 4 (CLDN6-MSG1 (H1L1)) [Fórmula 185]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L1)

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 37,7 mg/ml de solución de anticuerpo anti-CLDN6 (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) preparada en el Ejemplo 136 (2,5 ml) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L1) de 19,2 mg/ml (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (4,8 ml).

[0762]

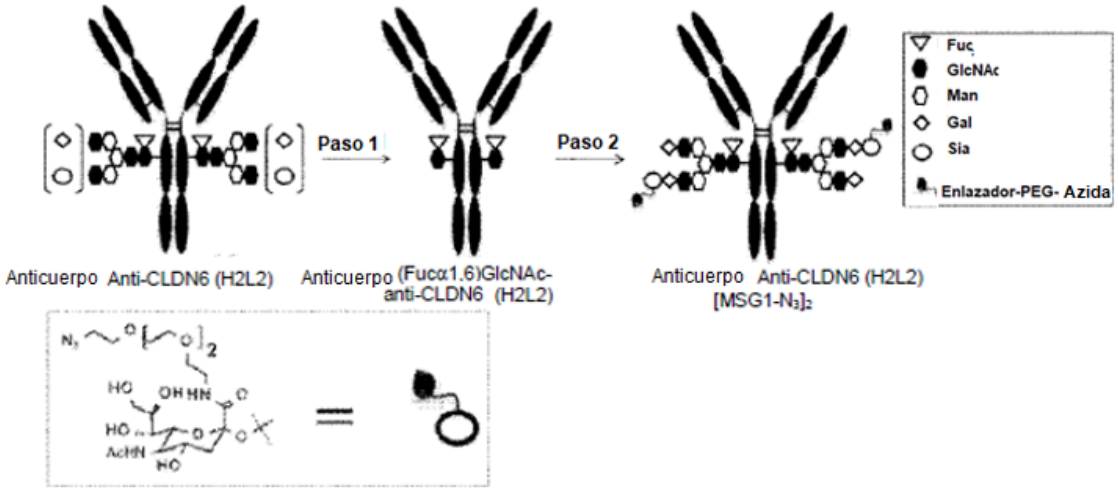
Paso 2: Anticuerpo anti-CLDN6 (H1L1)-[MSG1-$N_3$]$_2$

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 19,2 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fuc1α,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L1) (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (4,8 mL) para proporcionar una solución de 10,2 mg/mL de anticuerpo anti-CLDN6 (H1L1)-[MSG1-$N_3$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (7,2 ml).

[0763]

Ejemplo 62: Remodelación de la cadena de azúcar 5 (CLDN6-MSG1 (H2L2))

[Fórmula 186]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-CLDN6 (H2L2)

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 20 mg/ml de solución de anticuerpo anti-CLDN6 (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) preparada en el Ejemplo 136 (6 mL) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H2L2) de 21,84 mg/mL (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (5,7 ml).

[0764]

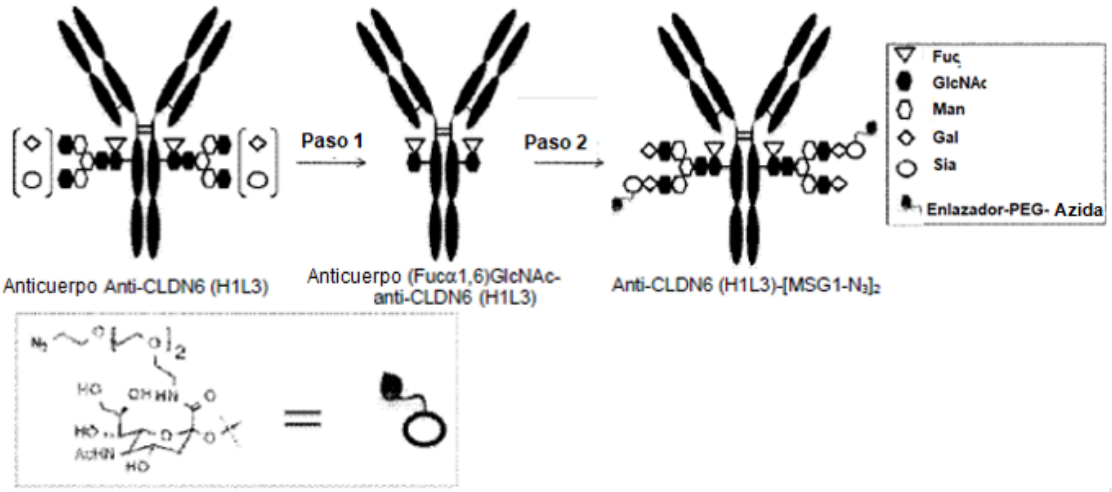
Paso 2: Anticuerpo anti-CLDN6 (H2L2)-[MSG1-$N_3$]$_2$

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 21,8 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L1) (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (5,7 mL) para proporcionar una solución de 10,2 mg/mL de anticuerpo anti-CLDN6 (H2L2)-[MSG1-$N_3$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (11,1 mL).

[0765]

Ejemplo 63: Remodelación de la cadena de azúcar 6 (CLDN6-SG1 (H1L3))

[Fórmula 187]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L3)

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 39,4 mg/ml de solución de anticuerpo anti-CLDN6 (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) preparada en el Ejemplo 136 (3 mL) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L3) de 39,2 mg/mL (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (4,5).

[0766]

Paso 2: Anticuerpo anti-CLDN6 (H1L3)-[MSG1-$N_3$]$_2$

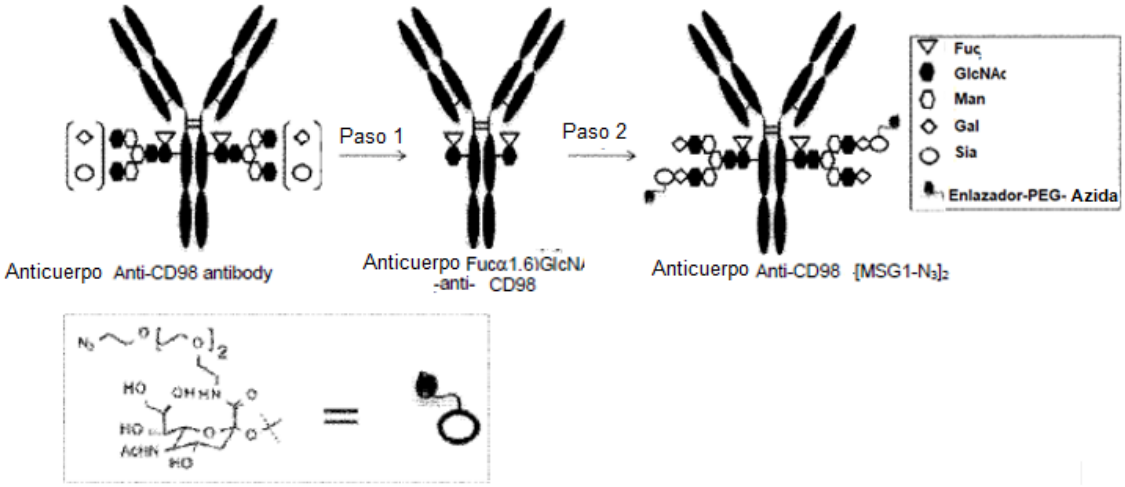
Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 39,2 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CLDN6 (H1L3) (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (4,5 mL) para proporcionar una solución de 9,83 mg/mL de anticuerpo anti-CLDN6 (H1L3)-[MSG1-$N_3$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (7,2 ml).

[0767]

Ejemplo 64: Remodelación de la cadena de azúcar 7

(CD98-MSG1)

[Fórmula 188]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-CD98

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 20 mg/ml de solución de anticuerpo anti-CD98 (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) preparada en el Ejemplo de Referencia 6 (6 mL) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CD98 de 21,7 mg/mL (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (4,7 ml).

[0768]

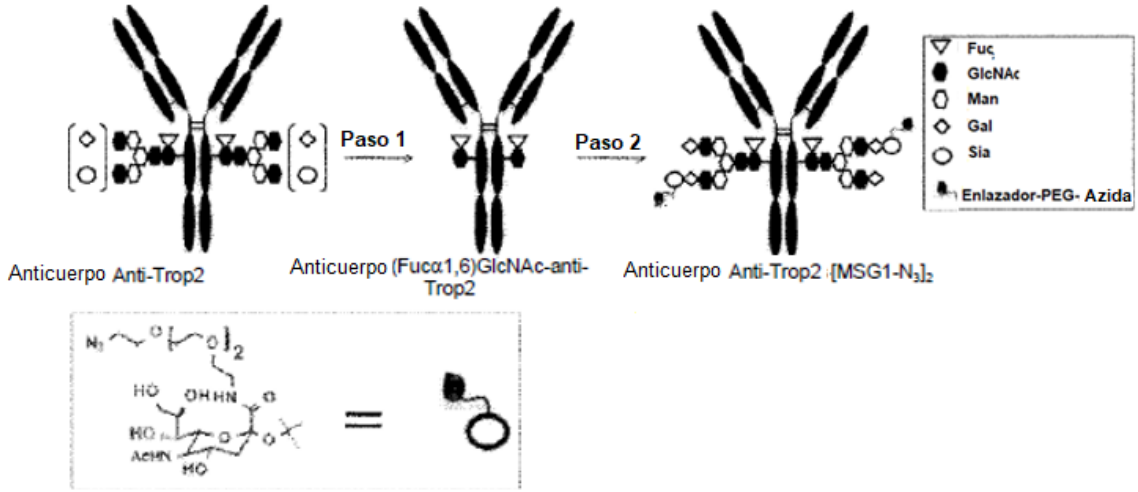
Paso 2: Anticuerpo anti-CD98-[MSG1-$N_3$]$_2$

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 21,7 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-CD98 (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (4,7 mL) para proporcionar una solución de 10,1 mg/mL de anticuerpo anti-CD98-[MSG1-$N_3$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (7,6 mL).

[0769]

Ejemplo 65: Remodelación de la cadena de azúcar 8

(TROP2-MSG1) [Fórmula 189]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-Trop2

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 20 mg/ml de solución de anticuerpo anti-Trop2 (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) obtenido en el Ejemplo de Referencia 5 (6 mL) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-Trop2 de 21,69 mg/mL (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (3,3 ml).

[0770]

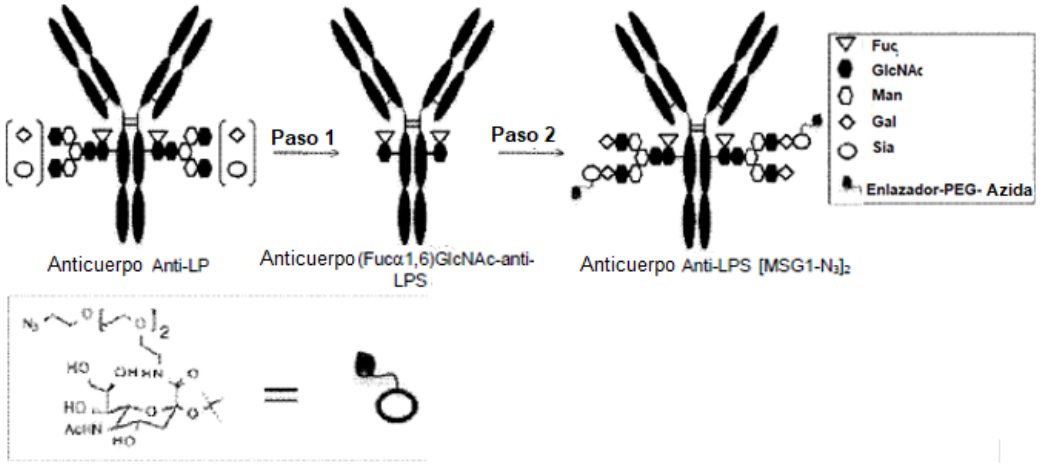
Paso 2: Anticuerpo anti-Trop2-$[MSG1\text{-}N_3]_2$

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 21,69 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-Trop2 (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (3,35 mL) para proporcionar una solución de 10,3 mg/mL de anticuerpo anti-Trop2-$[MSG1\text{-}N_3]_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (6,4 mL).

[0771]

Ejemplo 66: Remodelación de la cadena de azúcar 9

(LPS-MSG1) [Fórmula 190]




Paso 1: Anticuerpo (Fucα1,6)GlcNAc-anti-LPS

Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizaron utilizando aproximadamente 17 mg/ml de solución de anticuerpo anti-LPS (solución de histidina 25 mM (pH de 6,0), solución de sorbitol al 5 %) preparada en el Ejemplo de Referencia 4 (6,6 mL) para proporcionar una solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-LPS de 21,03 mg/mL (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (5,4 ml).

[0772]

Paso 2: Anticuerpo anti-LPS - $[MSG1\text{-}N_3]_2$

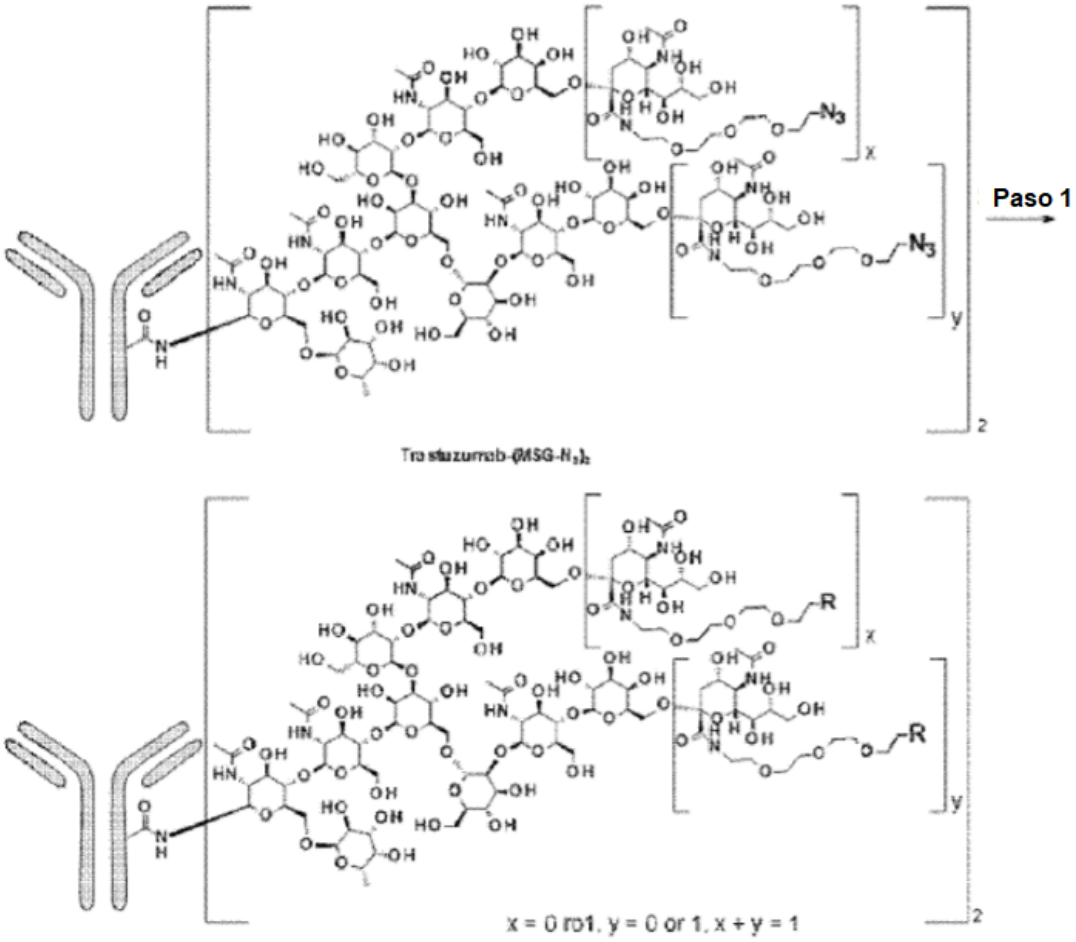
Las operaciones igual que en el paso 1 del Ejemplo 60 se realizaron utilizando 21,03 mg/mL de la solución de anticuerpo (Fucα1,6) GlcNAc-anti-LPS (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) obtenido en el paso 1 (5,4 mL) para proporcionar una solución de 9,89 mg/mL de anticuerpo anti-LPS-$[MSG1\text{-}N_3]_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0)) (7,9 mL).

[0773]

[Síntesis del ADC]

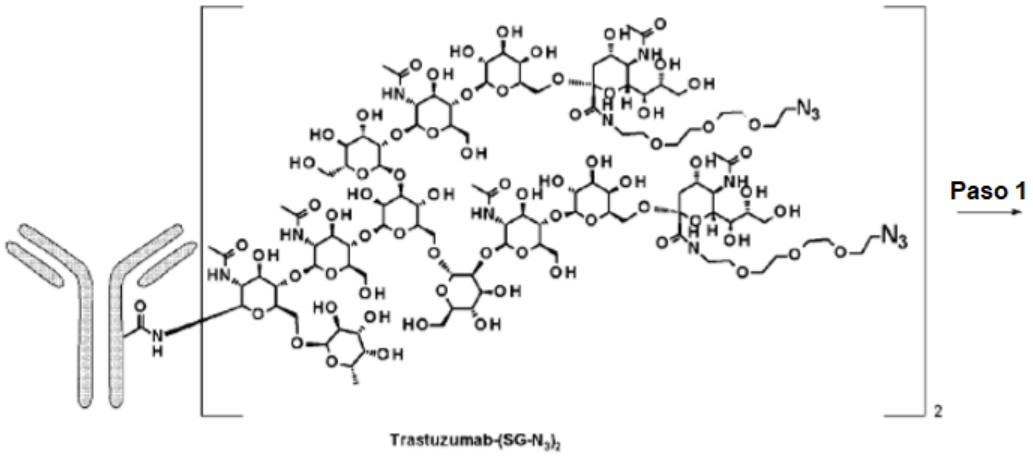
Los ADC descritos en los Ejemplos 67 a 71, 77 a 80, 82 a 88, 92 a 95, 109 a 114 y 120 se sintetizaron, tal y como se ilustra en la siguiente fórmula de reacción, conjugando el anticuerpo obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59 con un enlazador de fármacos. En la fórmula, R difiere entre los enlazadores de fármacos utilizados en esos Ejemplos.

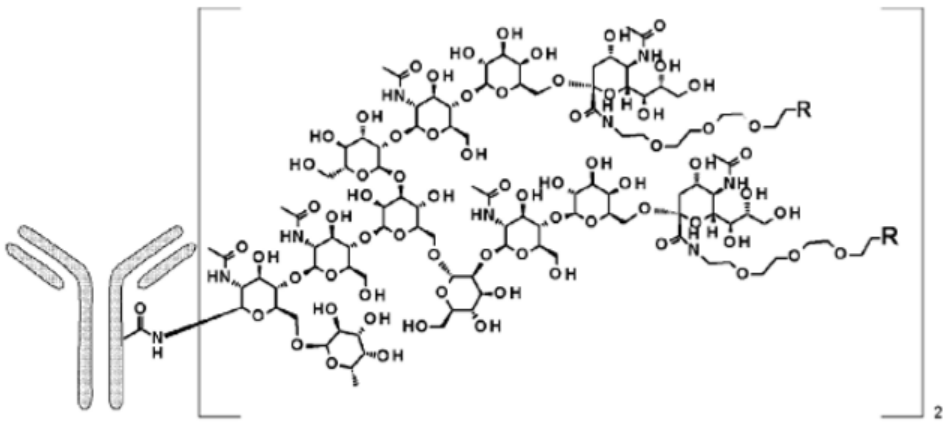
[Fórmula 191]




Los ADC descritos en los Ejemplos 72, 73, 75 y 91 se sintetizaron, tal y como se ilustra en la siguiente fórmula de reacción, conjugando el anticuerpo obtenido en el paso 2 del Ejemplo 58 con un enlazador de fármacos. En la fórmula, R difiere entre los enlazadores de fármacos utilizados en esos Ejemplos.

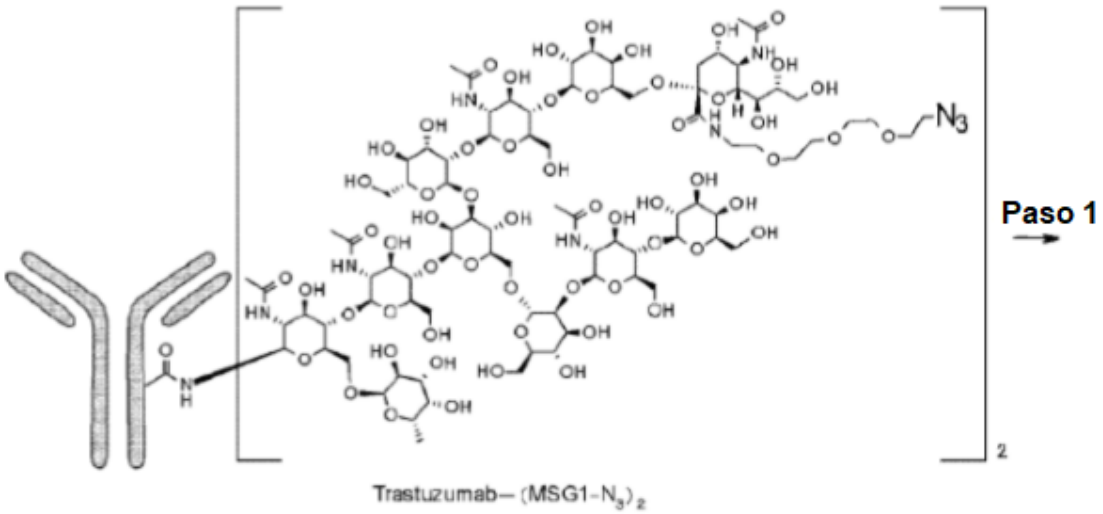
[Fórmula 192]

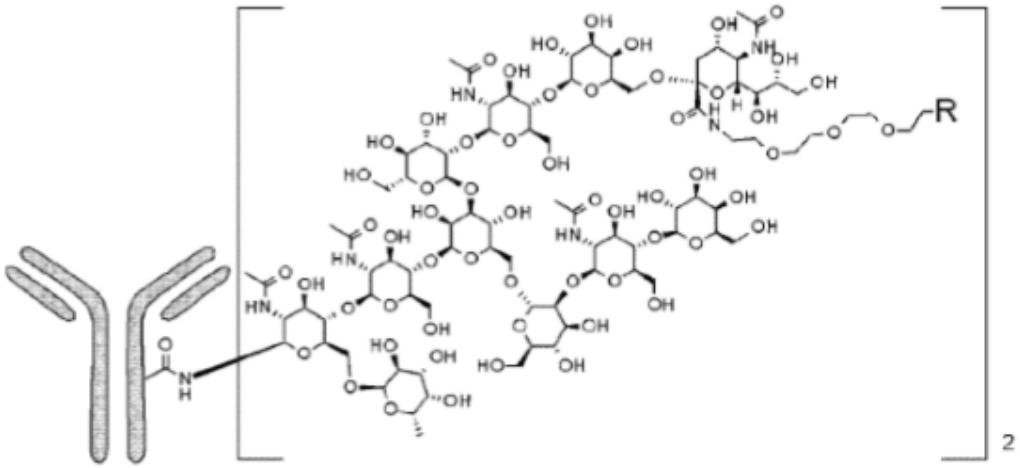


Los ADC descritos en los Ejemplos 74, 81, 89, 90, 96 a 105 y 118 se sintetizaron, tal y como se ilustra en la siguiente fórmula de reacción, conjugando el anticuerpo obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60 con un enlazador de fármacos. En la fórmula, el grupo R difiere entre los enlazadores de fármacos utilizados en esos Ejemplos.

[Fórmula 193]

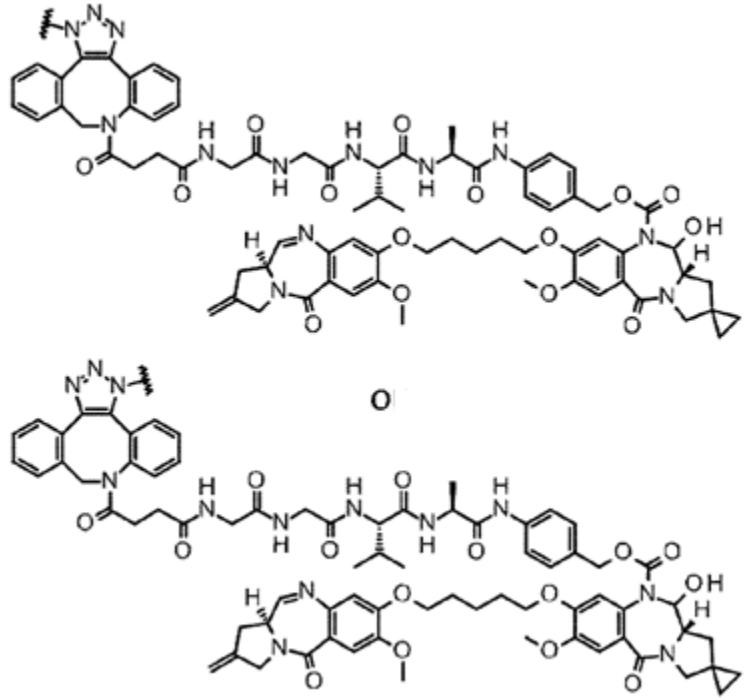


[0774]

Ejemplo 67: ADC1

[Fórmula 194]

R = 

El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 67 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.

[0775]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 24 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 14,00 mL de una solución del compuesto deseado. Esta solución se concentró usando la operación común A para proporcionar 0,75 mL de una solución del compuesto deseado.

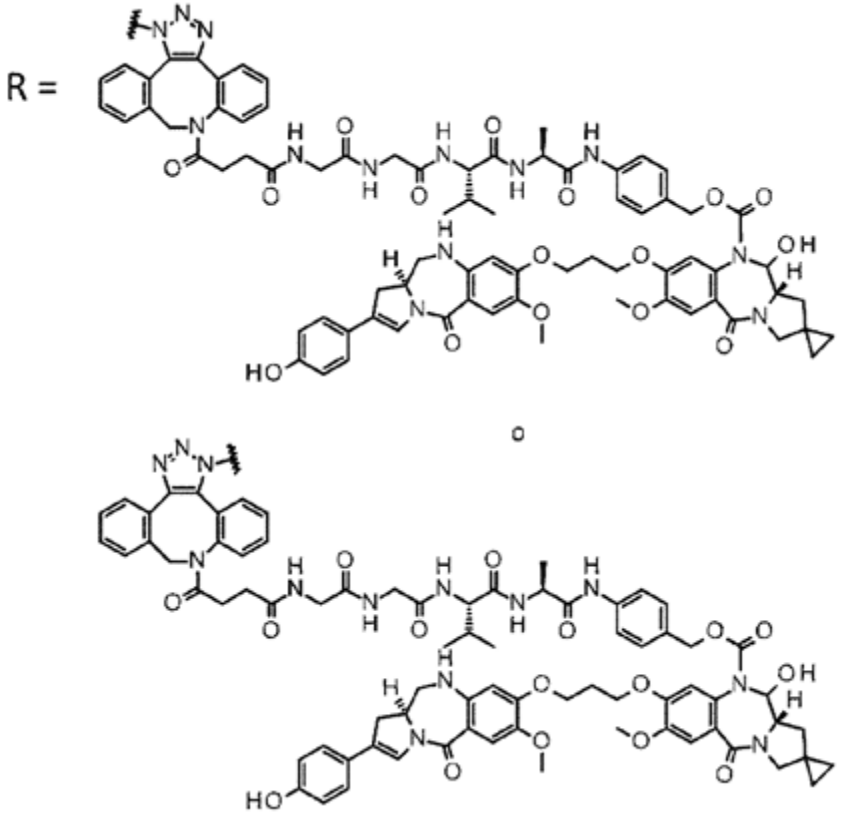
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 11,4 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,56 mg (86 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0776]

Ejemplo 68: ADC2

[Fórmula 195]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 68 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0777]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una

solución de 10 mM de dimetilsulfóxido del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 25 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente por 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

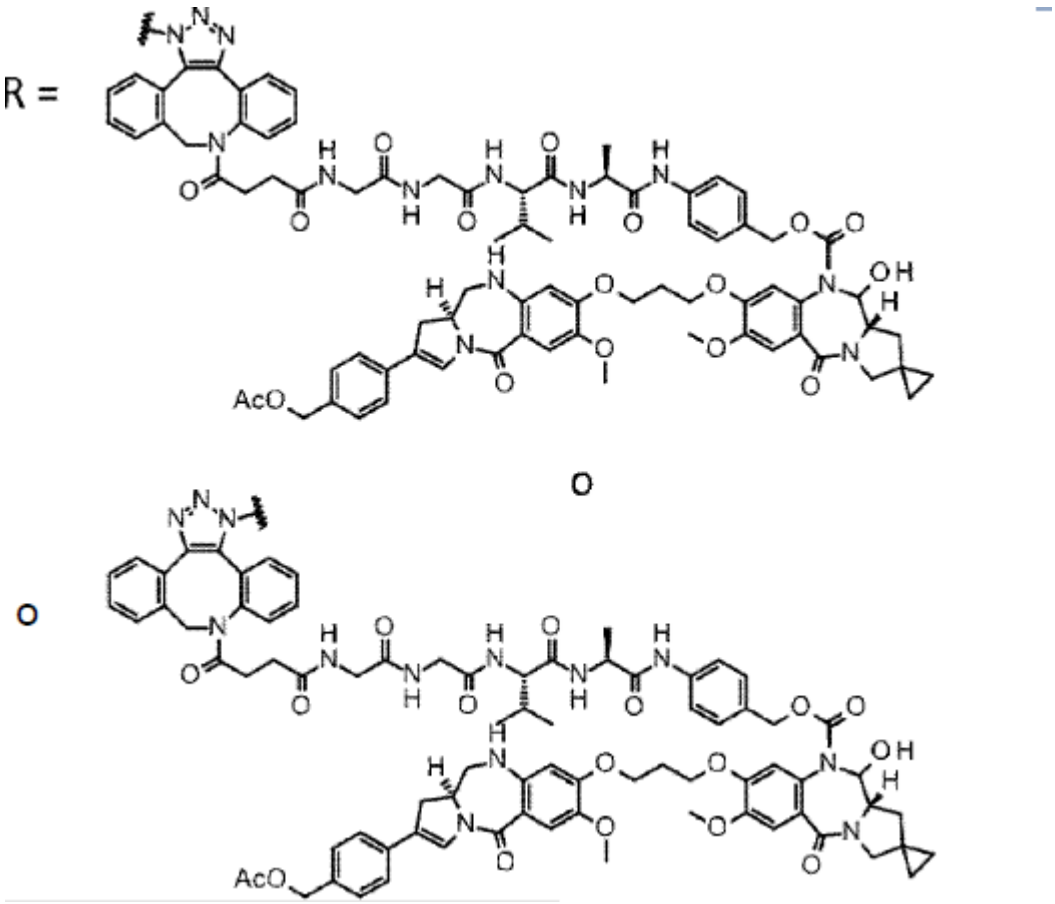
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,48 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,88 mg (89 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0778]

Ejemplo 69: ADC3

[Fórmula 196]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 69 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0779]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 26 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

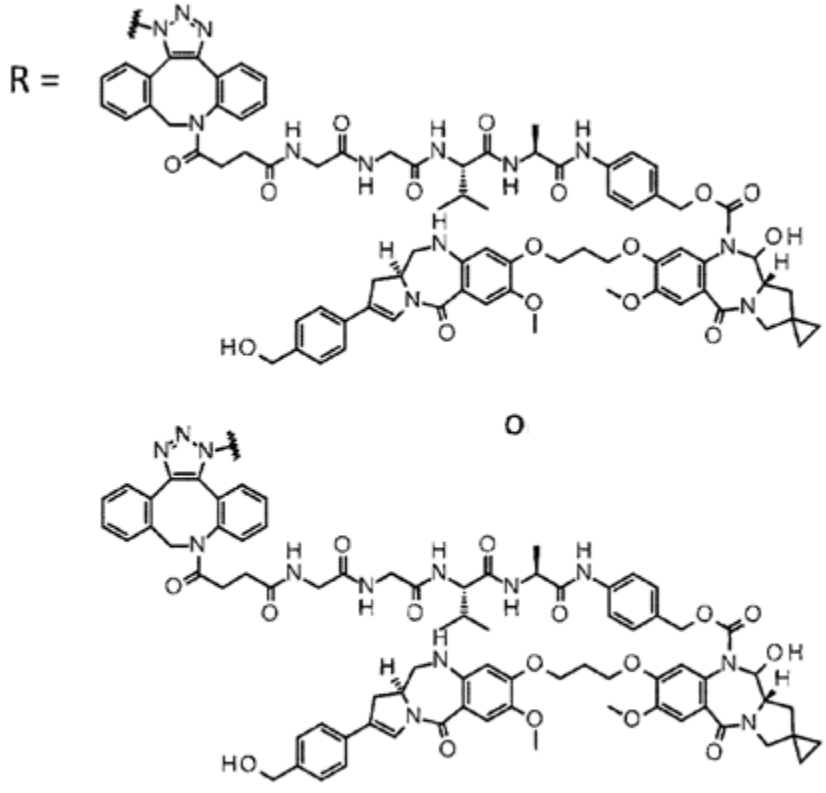
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,45 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,67 mg (89 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0780]

Ejemplo 70: ADC4

[Fórmula 197]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 70 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0781]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 27 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

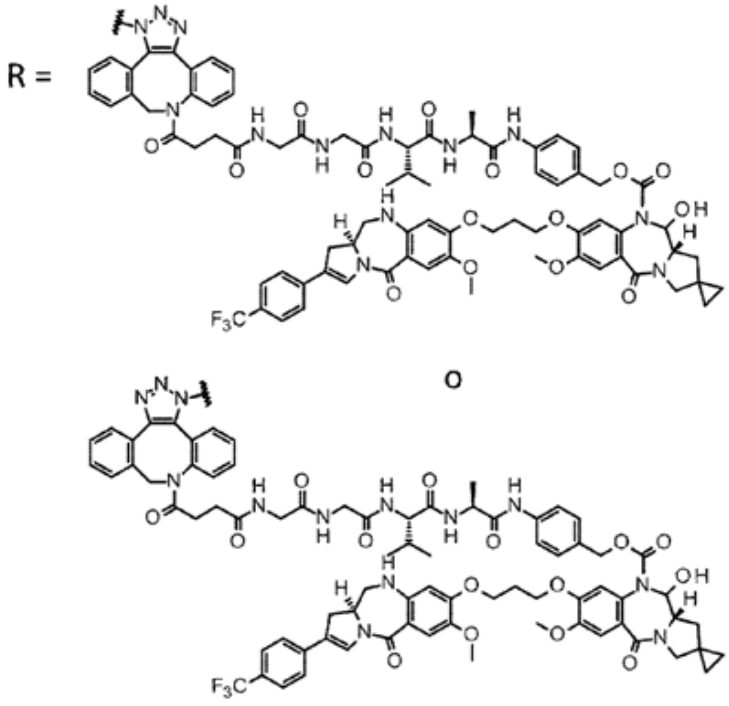
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,30 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,80 mg (78 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0782]

Ejemplo 71: ADC5

[Fórmula 198]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 71 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0783]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 28 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

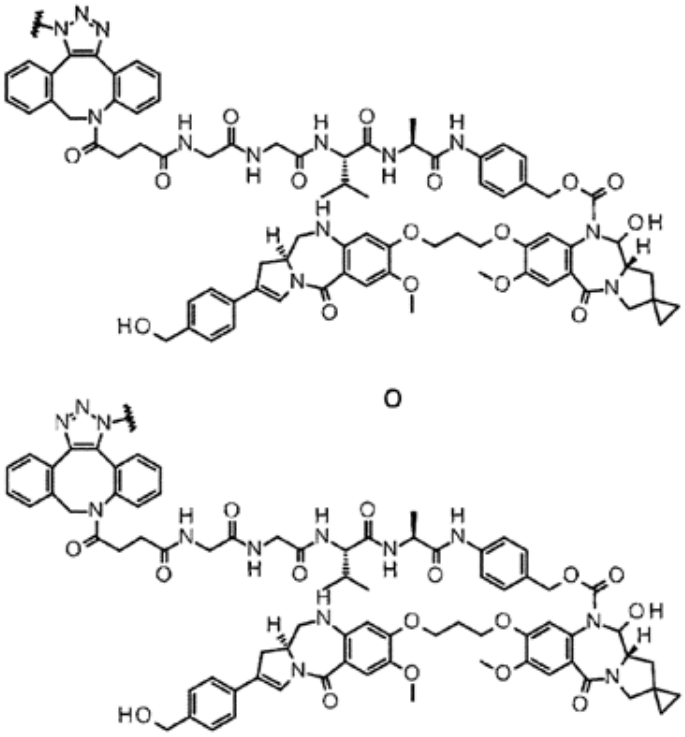
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,08 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,48 mg (65 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,6

[0784]

Ejemplo 72: ADC6

[Fórmula 199]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 72 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0785]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 58, se añadieron 1,2-propanodiol (0,835 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 27 (0,165 mL; 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 4,50 mL de una solución del compuesto deseado.

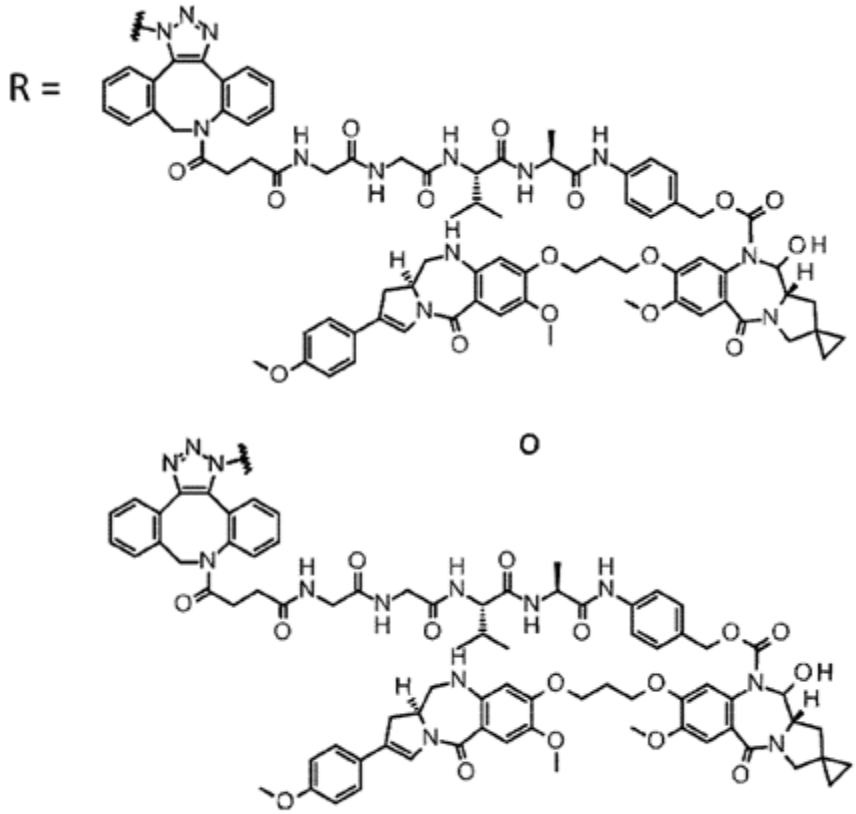
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,75 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,86 mg (79 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 3,8

[0786]

Ejemplo 73: ADC7

[Fórmula 200]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 73 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0787]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 58, se añadieron 1,2-propanodiol (0,835 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 4 (0,165 mL; 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo

(MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 4,50 mL de una solución del compuesto deseado.

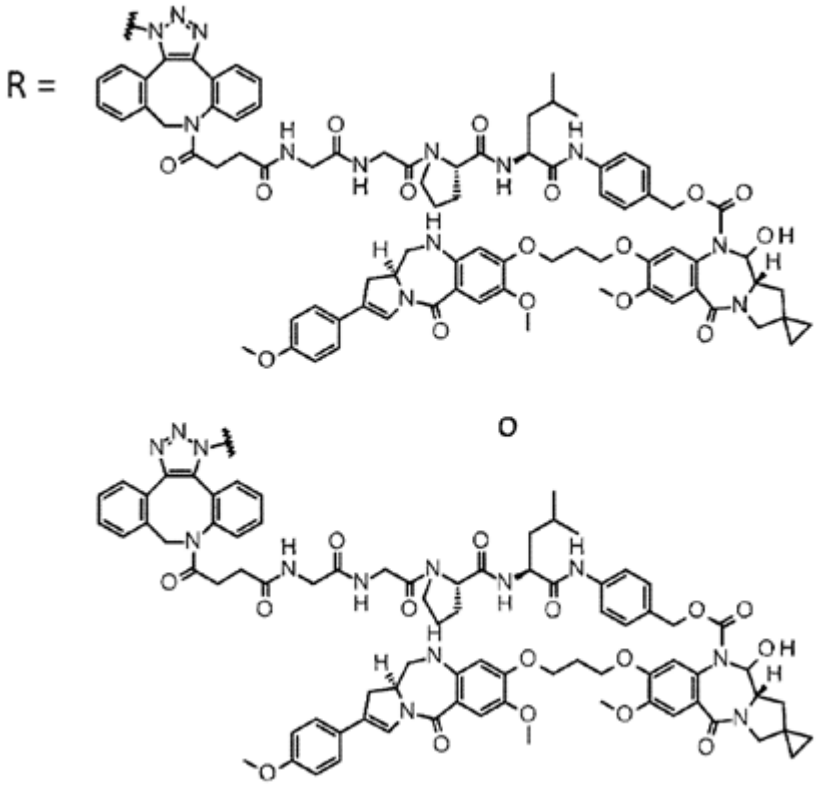
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,66 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,48 mg (75 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 3,8

[0788]

Ejemplo 74: ADC8

[Fórmula 201]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 74 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0789]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 29 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

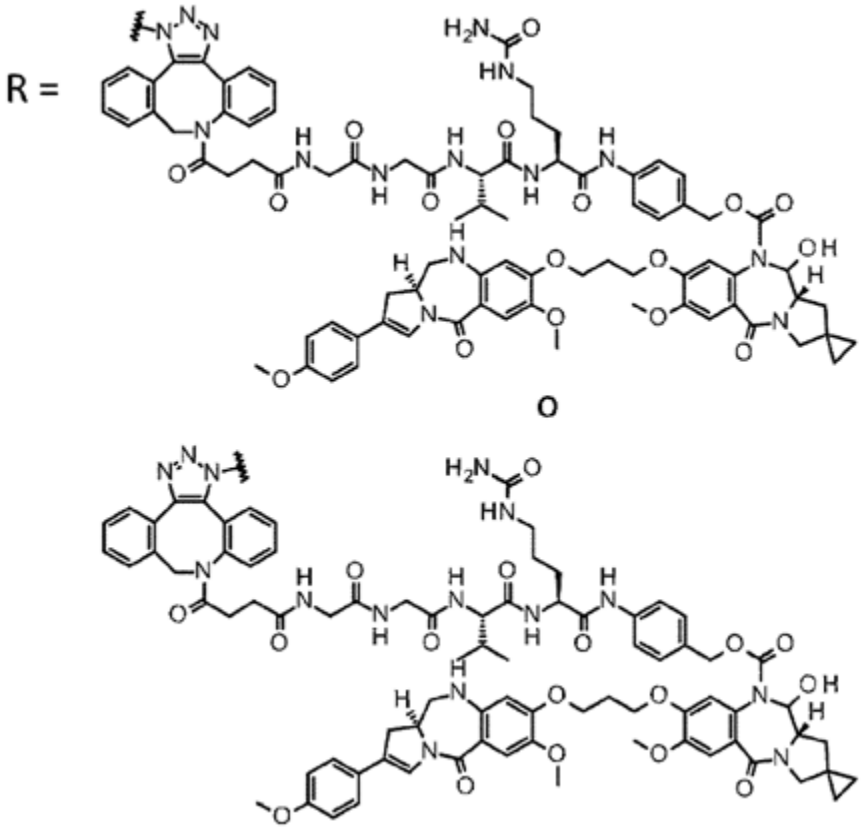
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,36 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,17 mg (82 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0790]

Ejemplo 75: ADC9

[Fórmula 202]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 75 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0791]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 58, se añadieron 1,2-propanodiol (0,835 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 9 del Ejemplo 9 (0,165 mL; 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 8,50 mL de una solución del compuesto deseado.

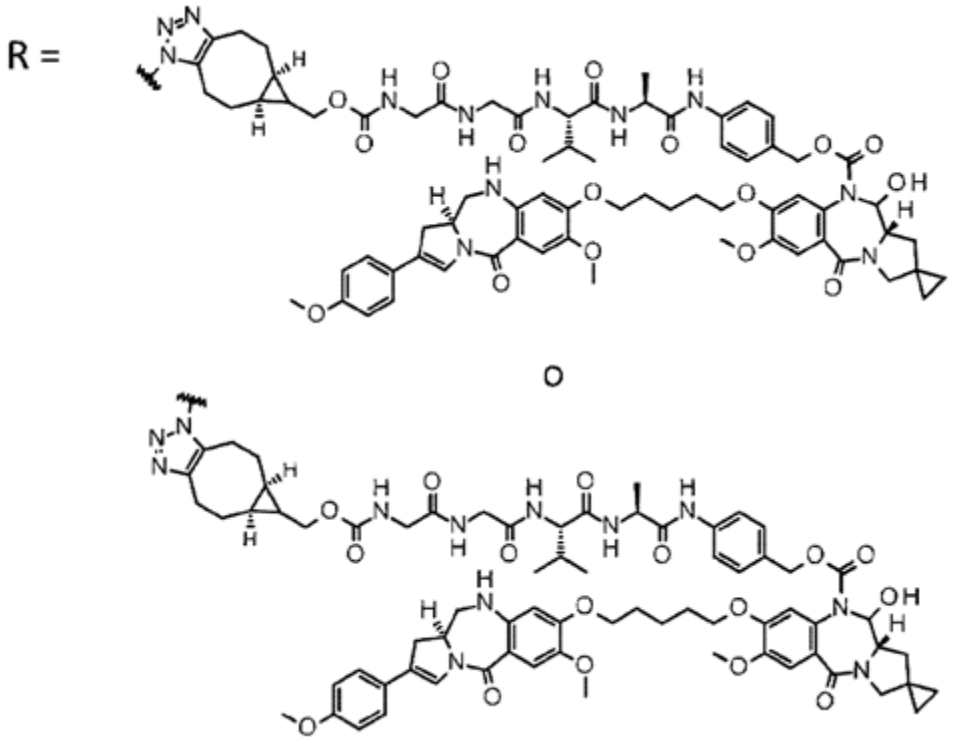
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 0,86 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,35 mg (73 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 3,6

[0792]

Ejemplo 76: ADC10

[Fórmula 203]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 76 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0793]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

Como se ilustra en la fórmula de reacción en el Ejemplo 106, a una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 0,400 ml) obtenida en el paso 2 del Ejemplo 61, se añadieron 1,2-propanodiol (0,200 mL), una solución de dimetil sulfóxido 10 mM del compuesto obtenido en el paso 2 del Ejemplo 30 (0,0549 mL; 20 equivalentes por molécula

de anticuerpo) y dimetil sulfóxido (0,145 ml) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 72 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 2,50 mL de una solución del compuesto deseado.

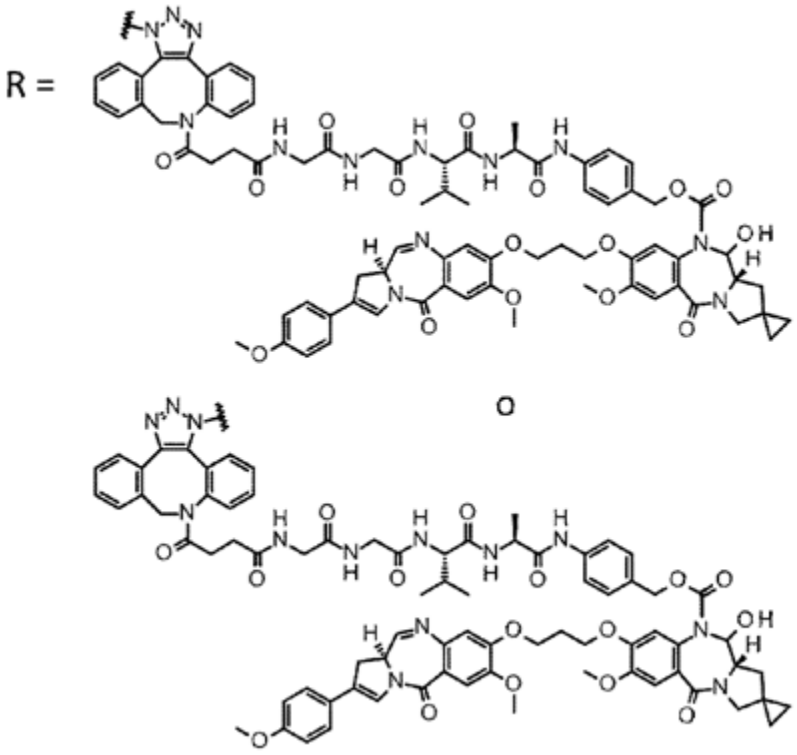
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,19 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 2,98 mg (75 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0794]

Ejemplo 77: ADC11

[Fórmula 204]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 77 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0795]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,88 mg/mL, 0,500 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,459 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 19 (0,0408 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D, y la solución resultante se concentró usando la operación común A, para proporcionar 0,470 mL de una solución del compuesto deseado.

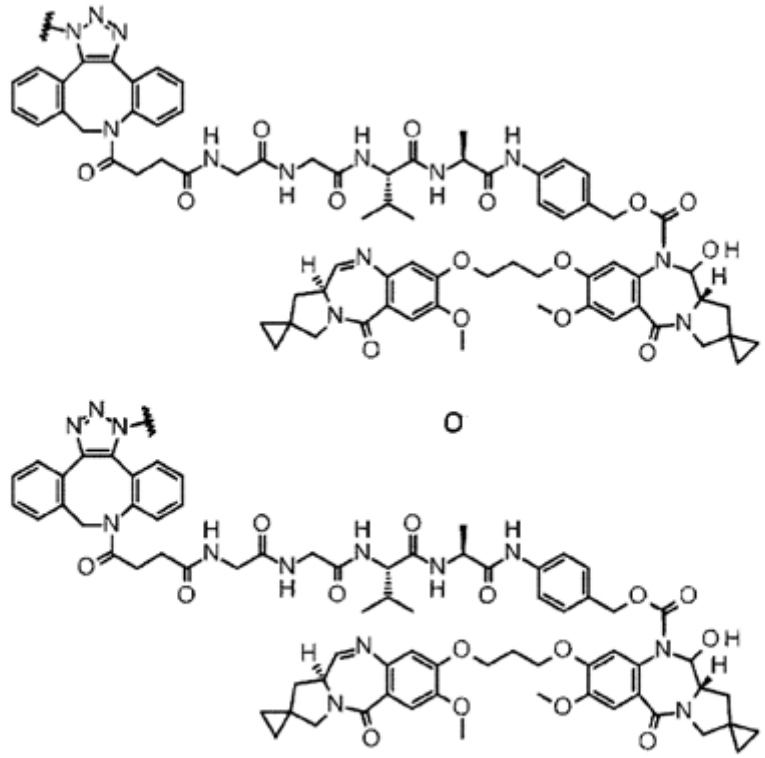
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 8,31 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 3,90 mg (79 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0796]

Ejemplo 78: ADC12

[Fórmula 205]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 78 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0797]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 20 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D, y la solución resultante luego se concentró usando la operación común A, para proporcionar 0,75 mL de una solución del compuesto deseado.

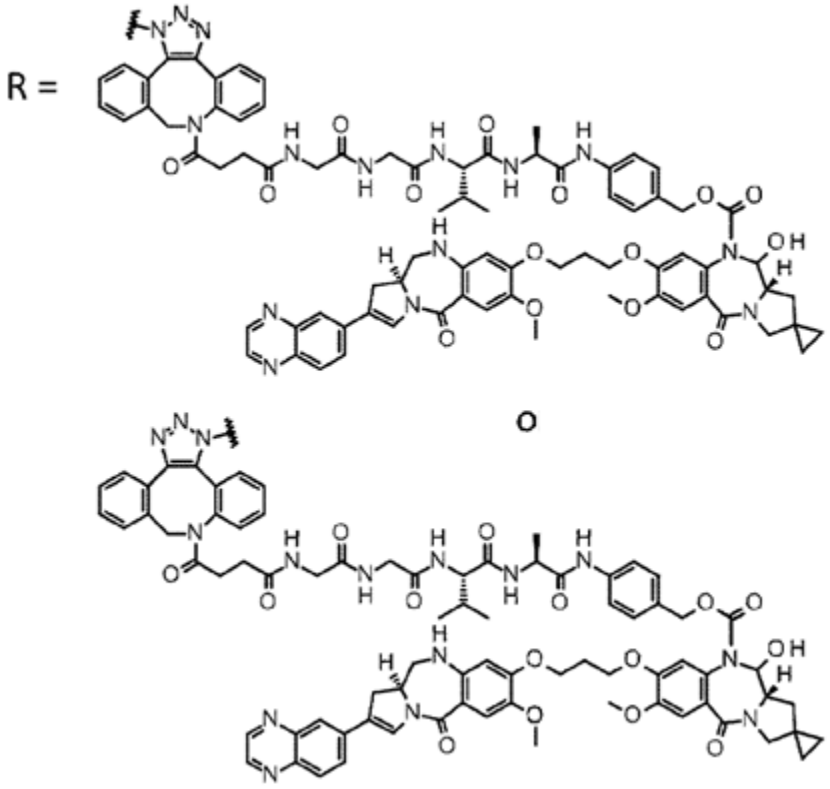
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 8,70 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,94 mg (69 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,7

[0798]

Ejemplo 79: ADC13

[Fórmula 206]




El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 79 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.

[0799]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 18 del Ejemplo 21 (0,0825

mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

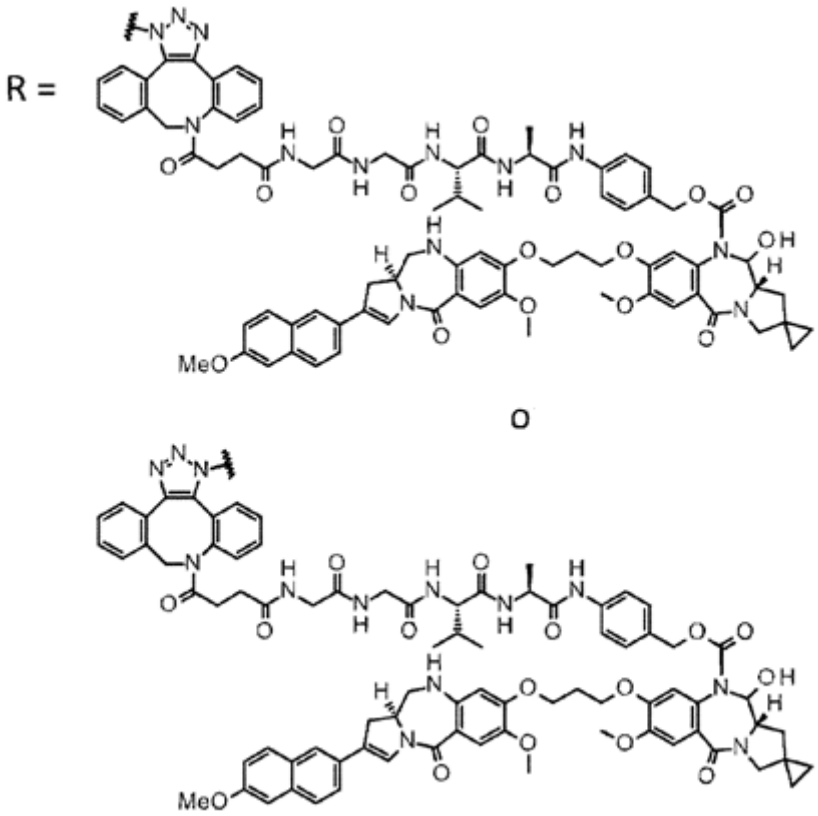
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 0,96 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 5,77 mg (58 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0800]

Ejemplo 80: ADC14

[Fórmula 207]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 80 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0801]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 22 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

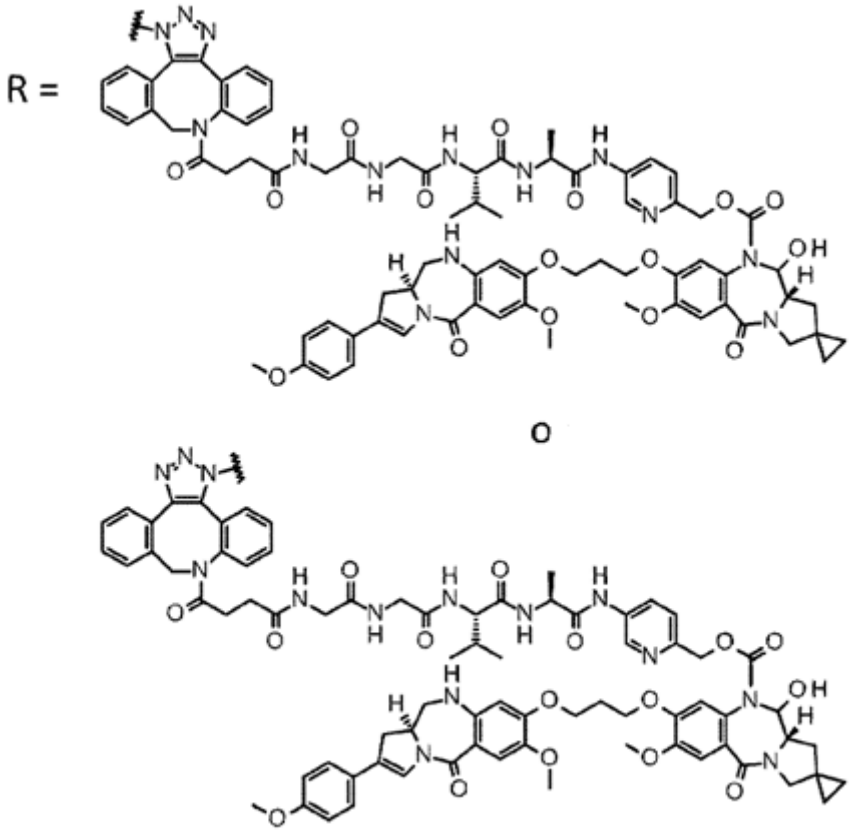
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,28 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,70 mg (77 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0802]

Ejemplo 81: ADC15

[Fórmula 208]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 81 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0803]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 23 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

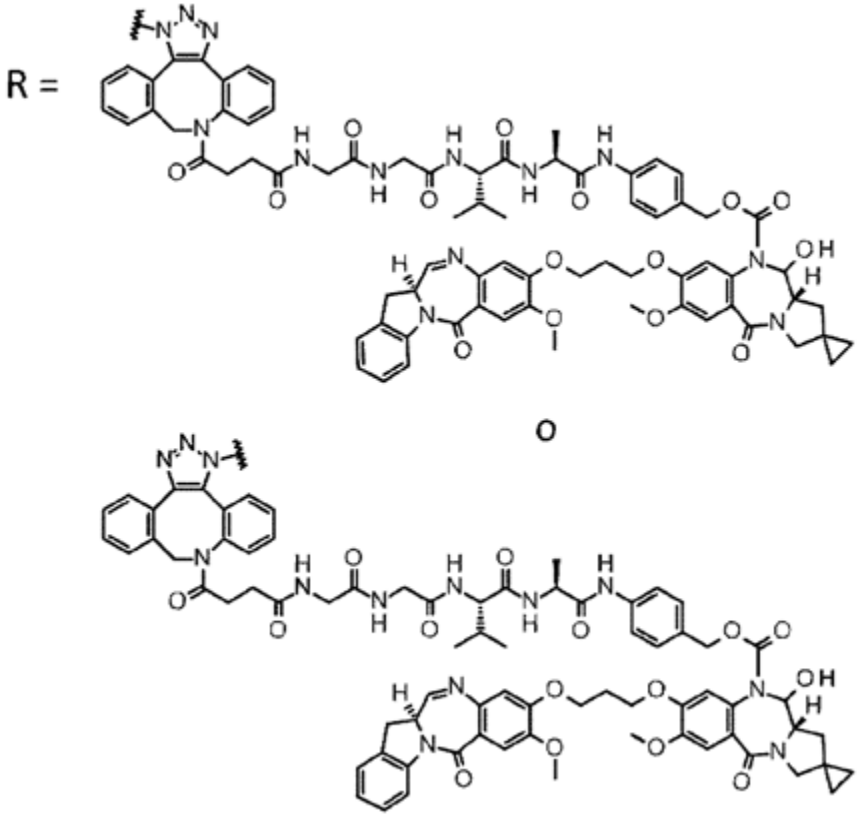
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,60 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,60 mg (96 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0804]

Ejemplo 82: ADC16

[Fórmula 209]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 82 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0805]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,88 mg/mL, 0,500 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,459 mL) y una

solución de 10 mM de dimetil sulfóxido del compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 34 (0,0408 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente por 1 día.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 10,5 mL de una solución del compuesto deseado. Esta solución se concentró usando la operación común A para proporcionar 0,500 mL de una solución del compuesto deseado.

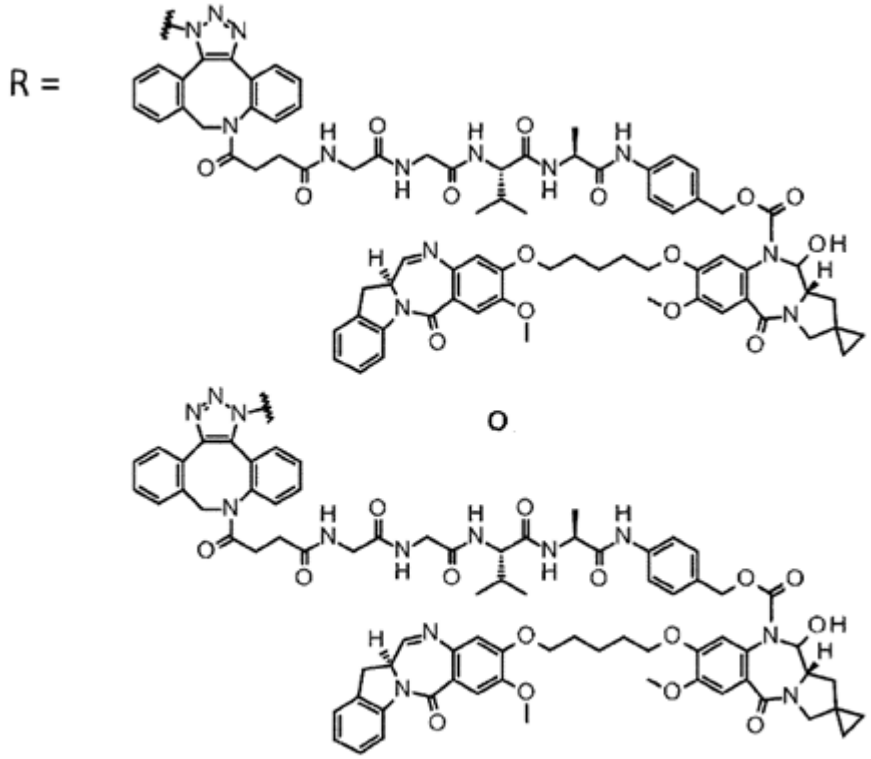
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 6,94 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 3,47 mg (70 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0806]

Ejemplo 83: ADC17

[Fórmula 210]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 83 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0807]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,88 mg/mL, 0,500 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,459 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 4 del Ejemplo 35 (0,0408 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 1 día.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D, y la solución resultante se concentró usando la operación común A, para proporcionar 0,500 mL de una solución del compuesto deseado.

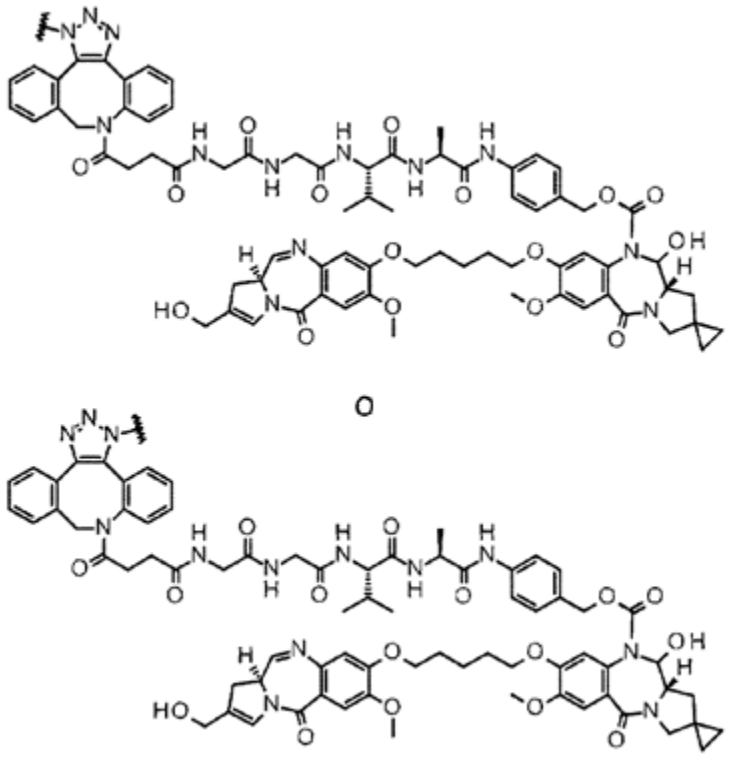
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 8,07 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 4,03 mg (82 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0808]

Ejemplo 84: ADC18

[Fórmula 211]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 86 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0809]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 7 del Ejemplo 36 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 1 día.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 14,0 mL de una solución del compuesto deseado. Esta solución se concentró usando la operación común A para proporcionar 0,700 mL de una solución del compuesto deseado.

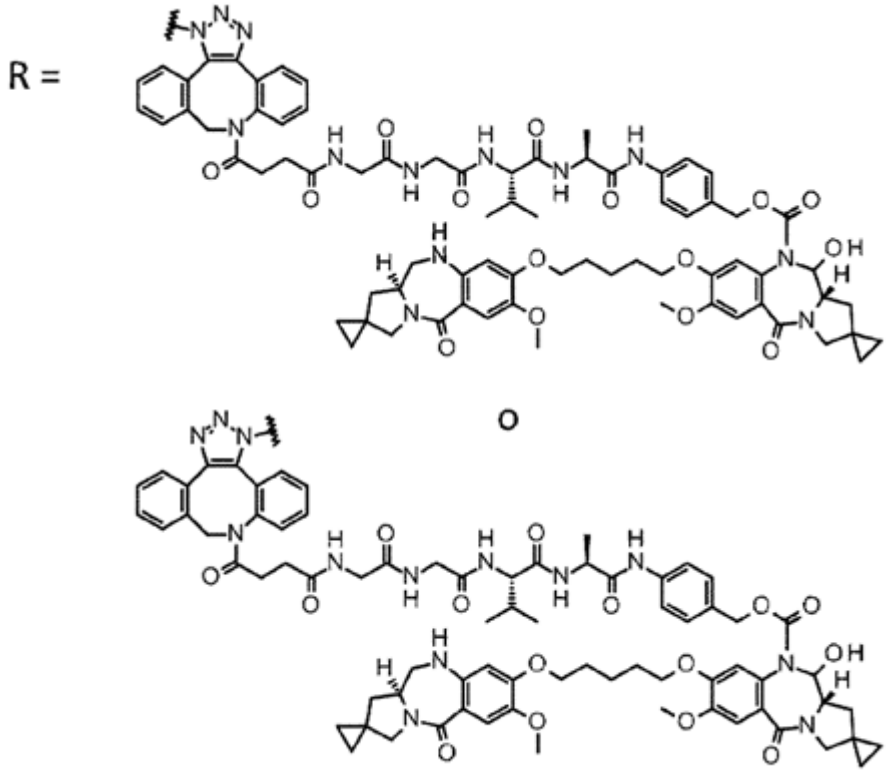
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 12,9 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,00 mg (90 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0810]

Ejemplo 85: ADC19

[Fórmula 212]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 85 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0811]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 37 (0,0825

mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

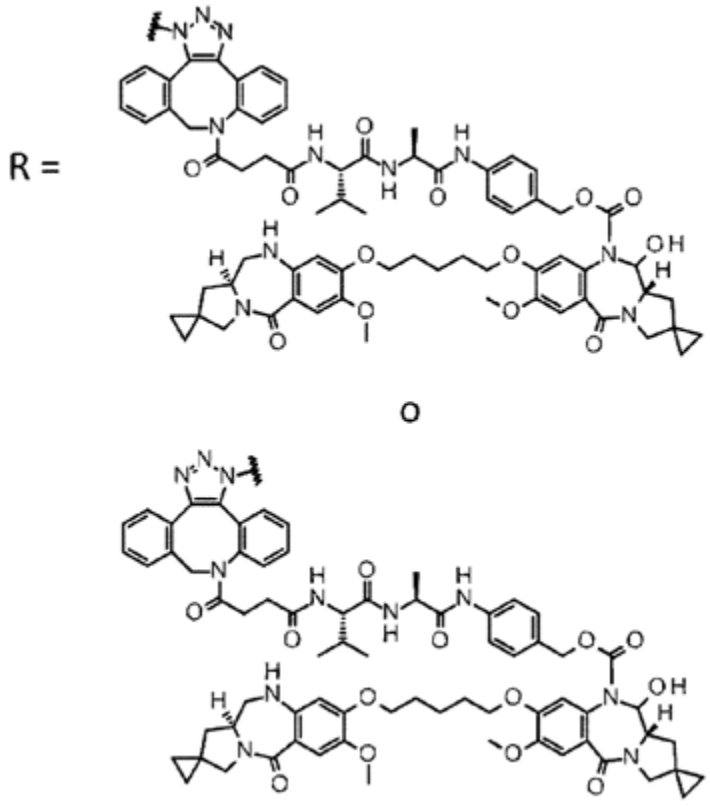
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,33 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,97 mg (80 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0812]

Ejemplo 86: ADC20

[Fórmula 213]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 86 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0813]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 38 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

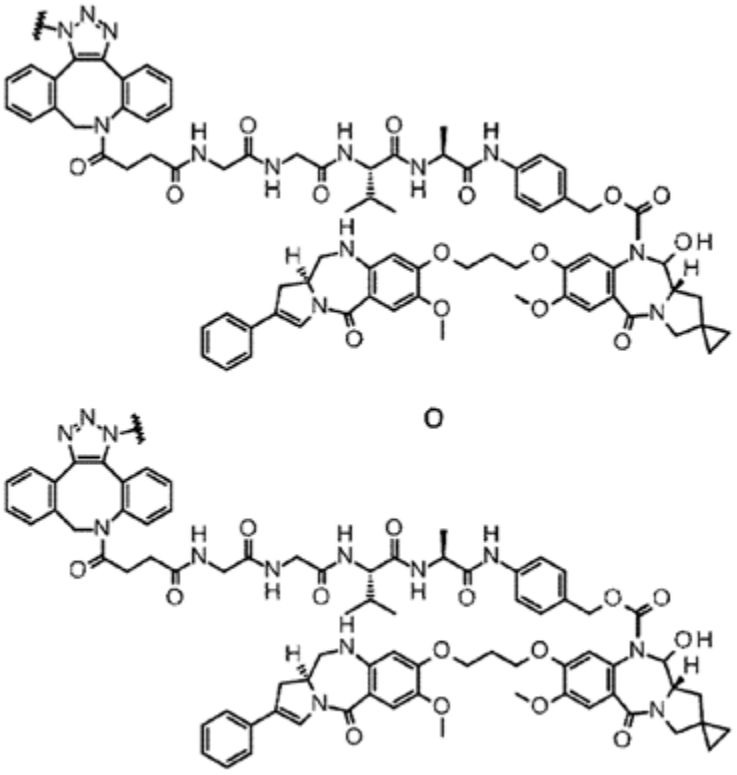
Concentración de anticuerpos: 1,56 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,37 mg (94 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 2,0

[0814]

Ejemplo 87: ADC21

[Fórmula 214]

R =



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 87 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0815]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 6 del Ejemplo 39 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

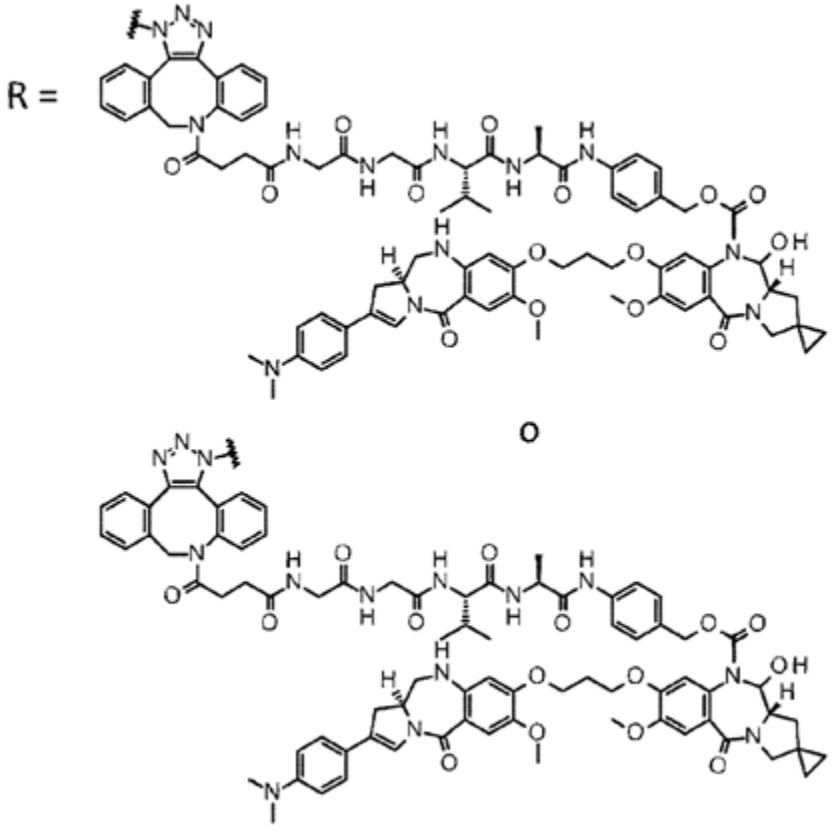
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,89 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 11,4 mg (cuantitativo), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0816]

Ejemplo 88: ADC22

[Fórmula 215]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el Ejemplo 88 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.

[0817]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 6 del Ejemplo 40 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el

resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

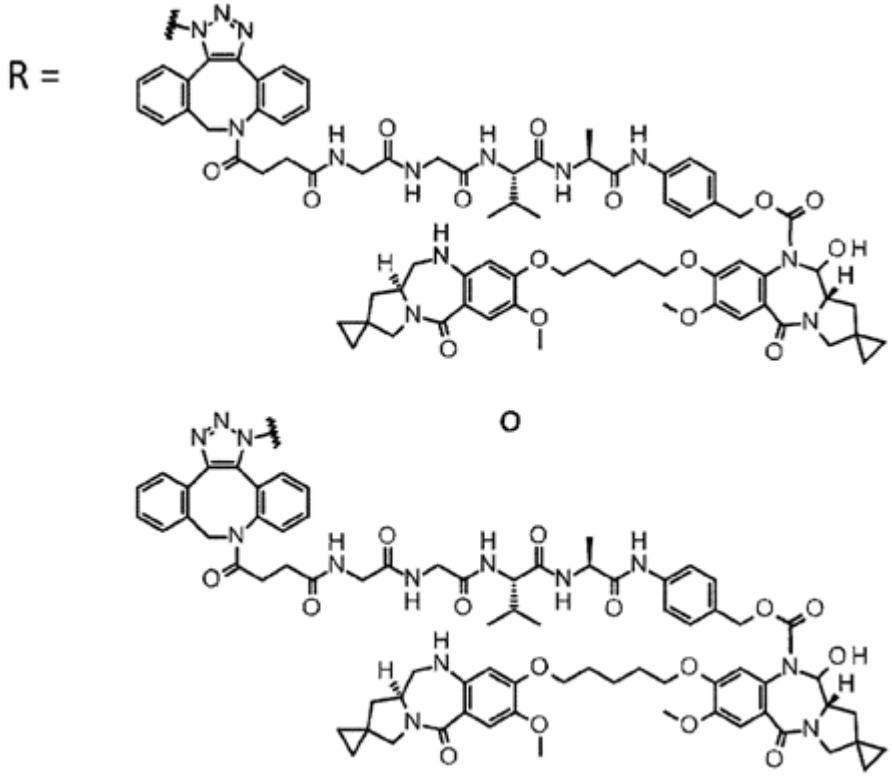
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,47 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,84 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0818]

Ejemplo 89: ADC23

[Fórmula 216]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 89 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0819]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 37 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

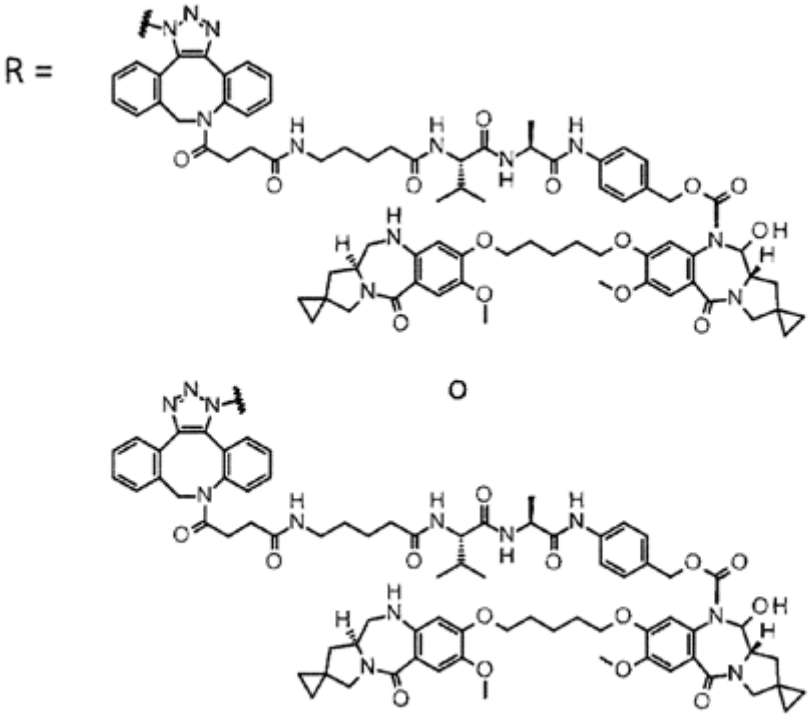
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,46 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,76 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0820]

Ejemplo 90: ADC24

[Fórmula 217]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 90 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0821]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 2 del Ejemplo 41 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

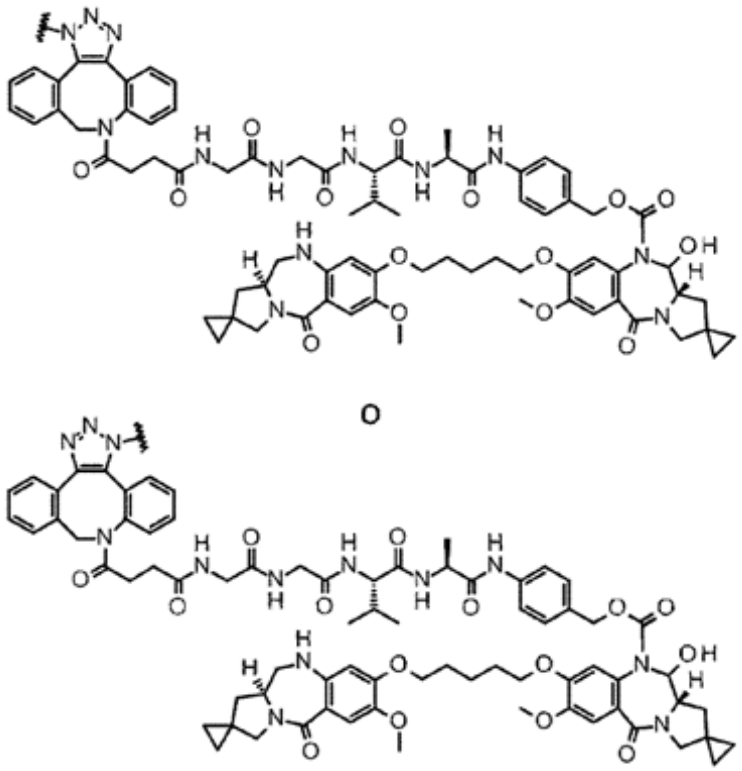
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,53 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,17 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0822]

Ejemplo 91: ADC25

[Fórmula 218]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el Ejemplo 91 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.

[0823]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 58, se añadieron 1,2-propanodiol (0,835 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 37 (0,165 mL; 24 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

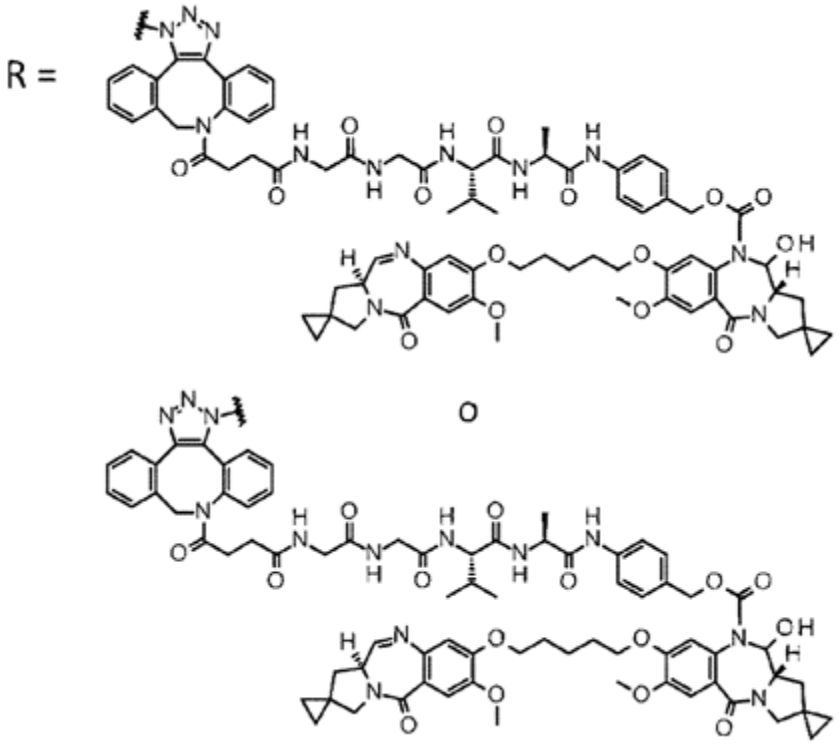
Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 10,5 mL de una solución del compuesto deseado. Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 0,73 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,70 mg (77 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 3,8

[0824]

Ejemplo 92: ADC26

[Fórmula 219]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 92 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0825]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,88 mg/mL, 0,500 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,459 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 15 (0,0408 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 1 día.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado. Esta solución se concentró usando la operación común A para proporcionar 0,420 mL de una solución del compuesto deseado.

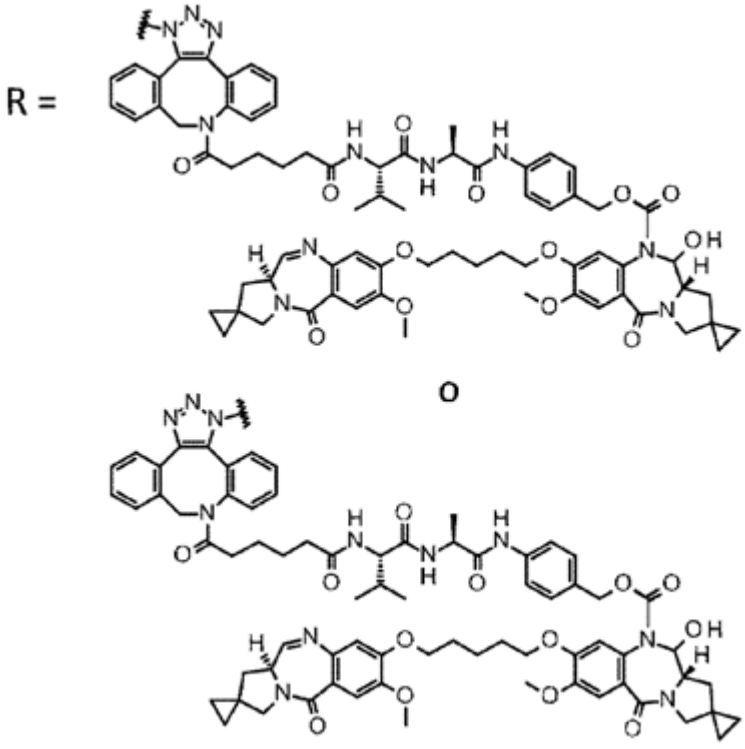
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 7,27 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 3,54 mg (72 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0826]

Ejemplo 93: ADC27

[Fórmula 220]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 93 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0827]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,88 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 16 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 1 día.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 10,5 mL de una solución del compuesto deseado. Esta solución se concentró usando la operación común A para proporcionar 0,850 mL de una solución del compuesto deseado.

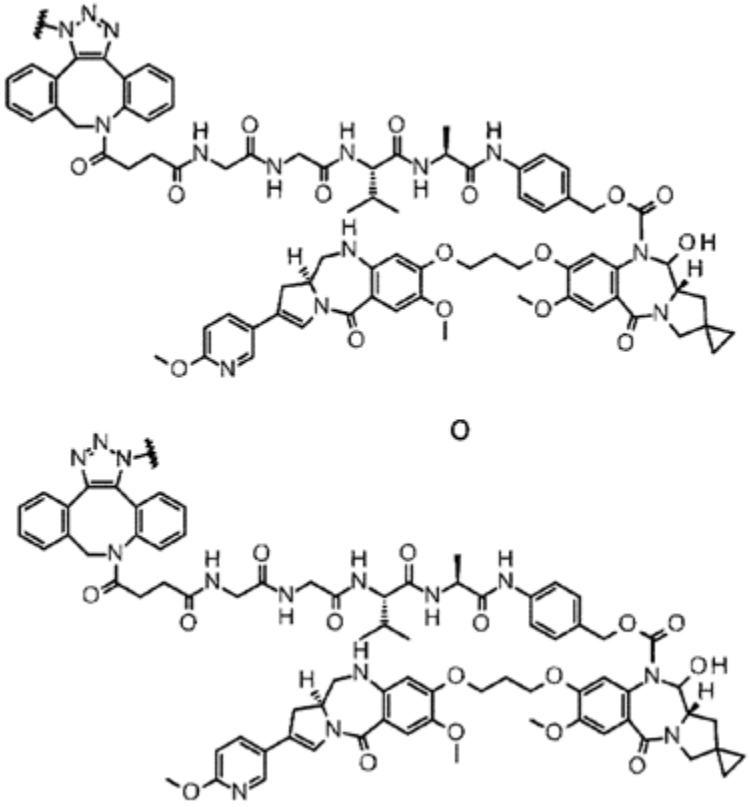
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 8,90 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,56 mg (77 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0828]

Ejemplo 94: ADC28

[Fórmula 221]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 94 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0829]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 17 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

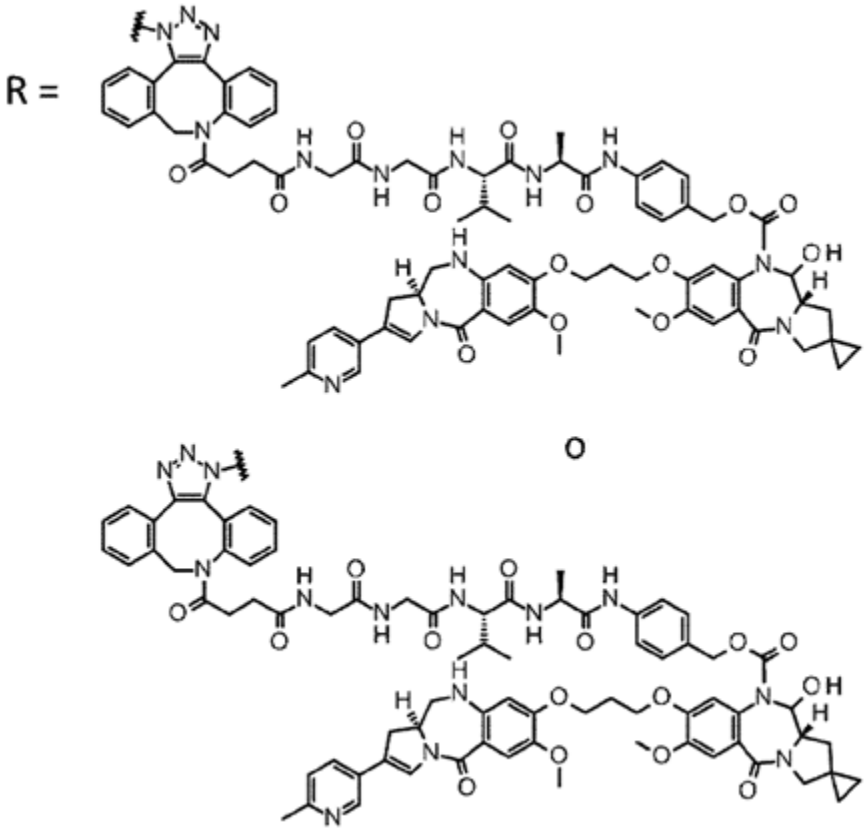
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,24 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,43 mg (73 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,5

[0830]

Ejemplo 95: ADC29

[Fórmula 222]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 95 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0831]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 18 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el

resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

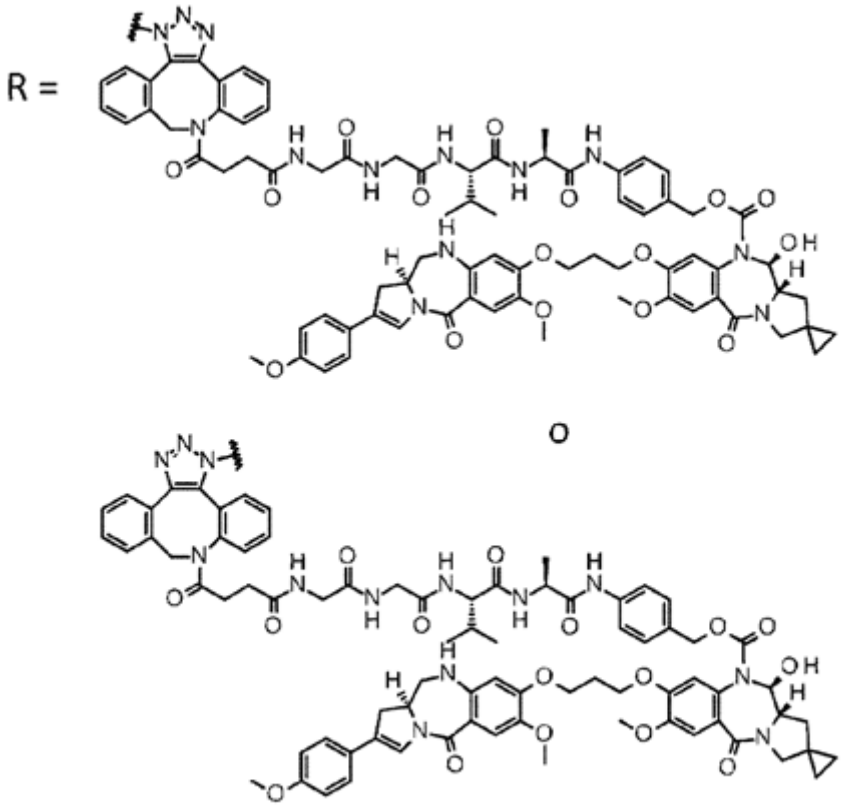
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,29 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,76 mg (76 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0832]

Ejemplo 96: ADC30

[Fórmula 223]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 96 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0833]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 5,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (4,59 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 4 (0,413 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 30,0 mL de una solución del compuesto deseado.

Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

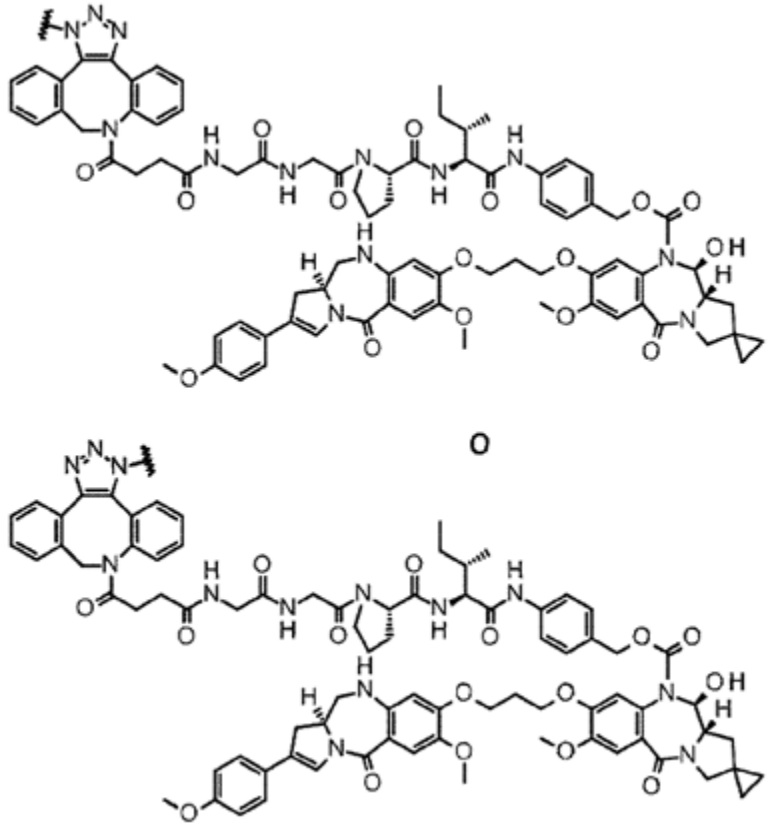
Concentración de anticuerpos: 1,30 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 38,9 mg (78 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0834]

Ejemplo 97: ADC31

[Fórmula 224]

R =



o



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 97 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0835]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 5 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

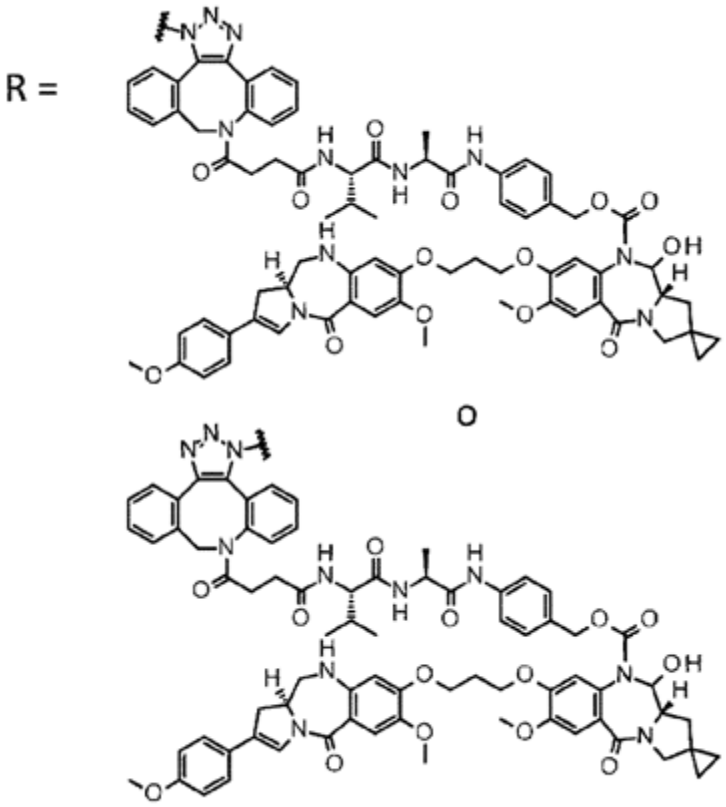
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,47 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,82 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0836]

Ejemplo 98: ADC32

[Fórmula 225]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 98 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0837]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 6 (0,0825 mL;

12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

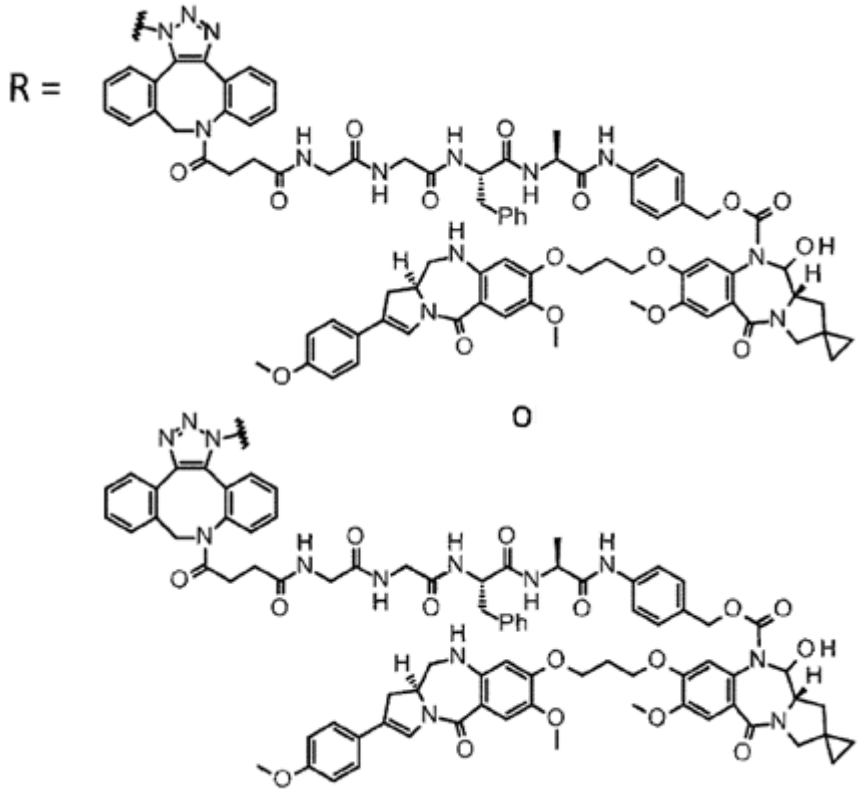
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,35 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,10 mg (81 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0838]

Ejemplo 99: ADC33

[Fórmula 226]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 99 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0839]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 10 del Ejemplo 7 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

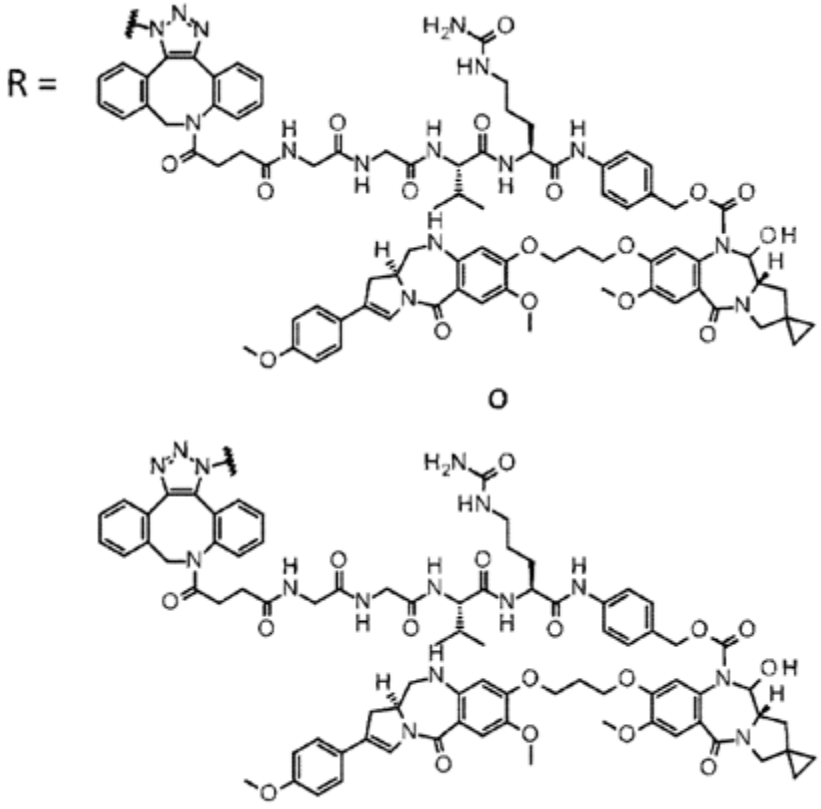
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,41 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,44 mg (84 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0840]

Ejemplo 100: ADC34

[Fórmula 227]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 100 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0841]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 9 del Ejemplo 9 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

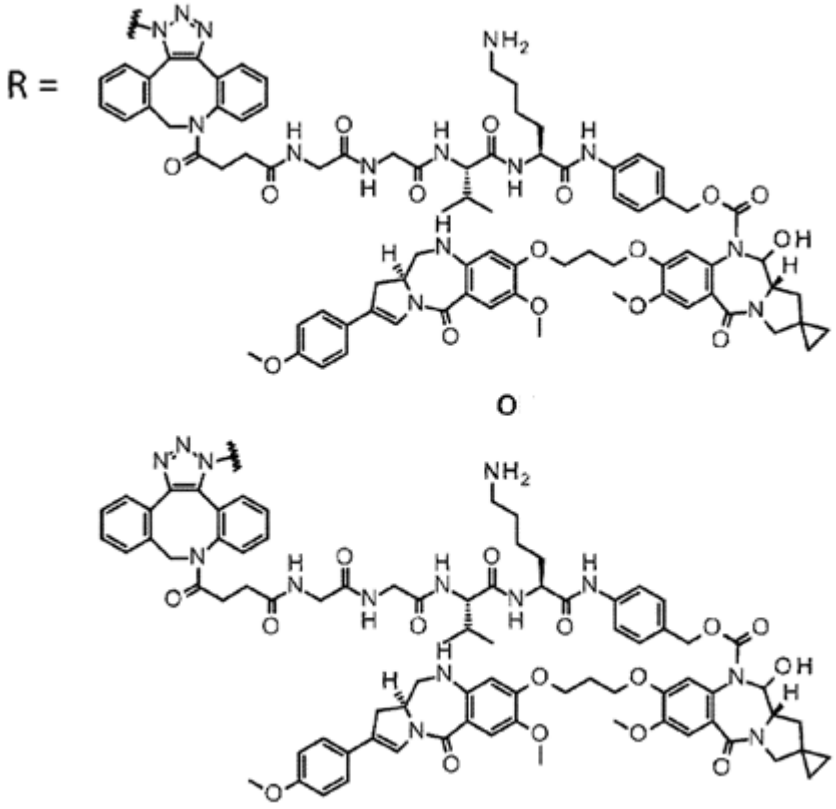
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,47 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,79 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0842]

Ejemplo 101: ADC35

[Fórmula 228]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 101 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0843]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 10 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente,

y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

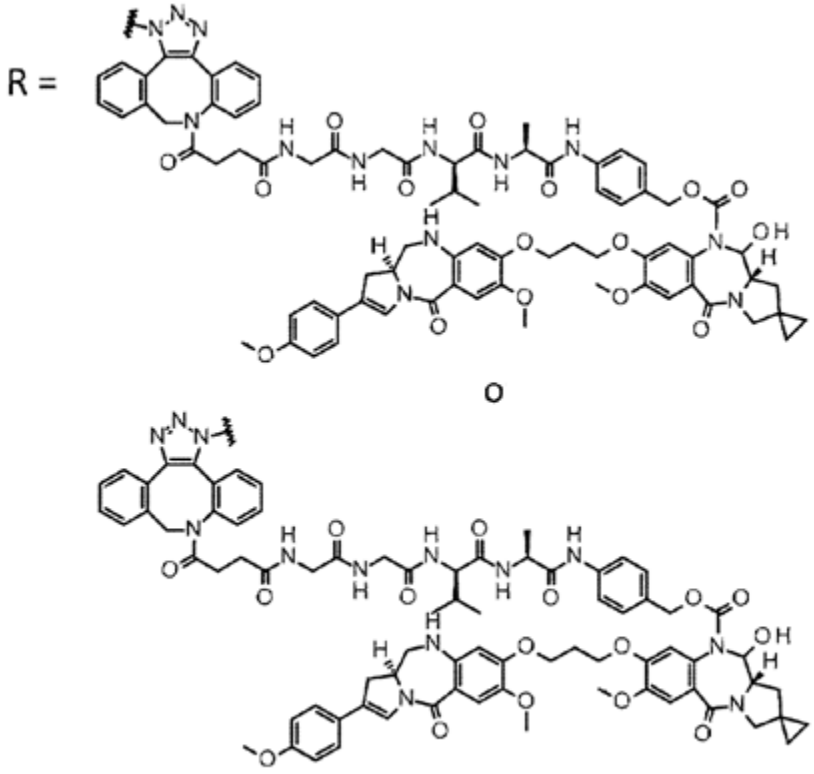
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,67 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,0 mg (cuantitativo), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0844]

Ejemplo 102: ADC36

[Fórmula 229]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 103 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0845]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 11 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

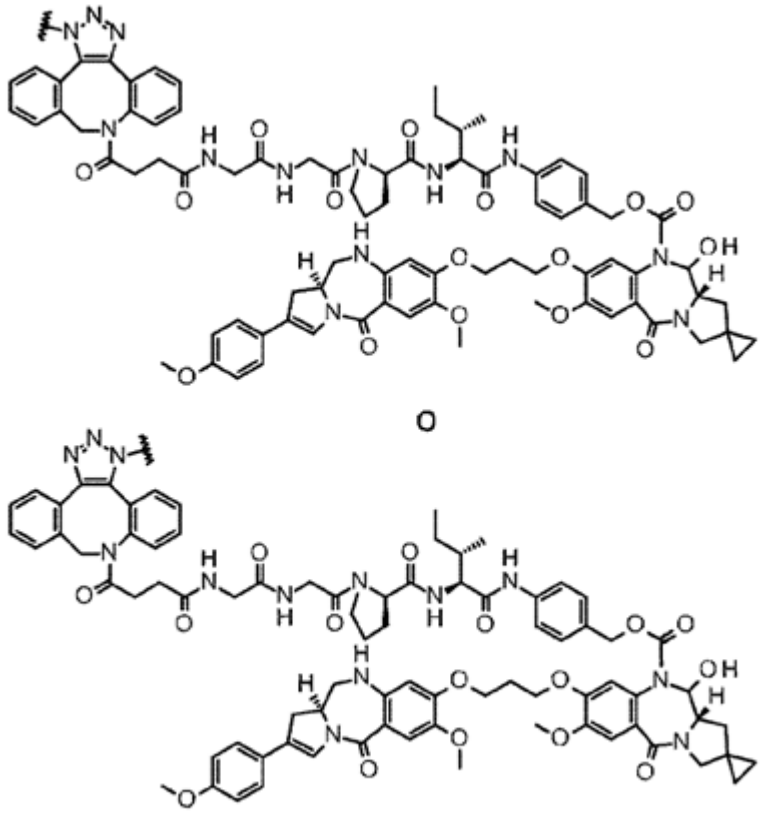
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,40 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,39 mg (84 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0846]

Ejemplo 103: ADC37

[Fórmula 230]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 103 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0847]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 14 del Ejemplo 12 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

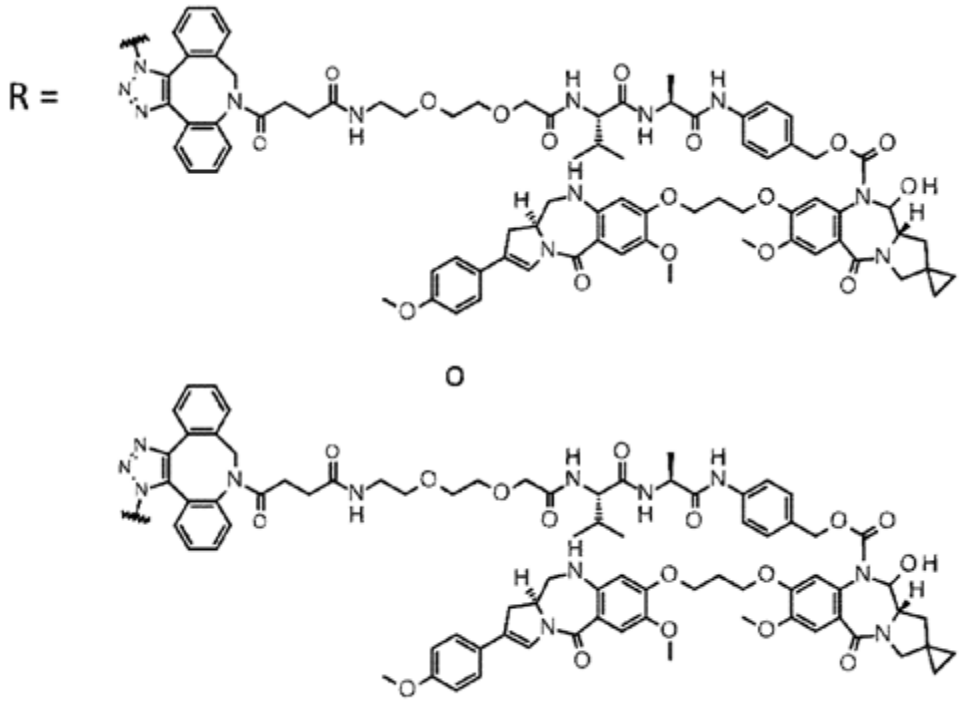
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,41 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,49 mg (85 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0848]

Ejemplo 104: ADC:38

[Fórmula 231]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 104 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0849]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 2 del Ejemplo 13 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el

resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

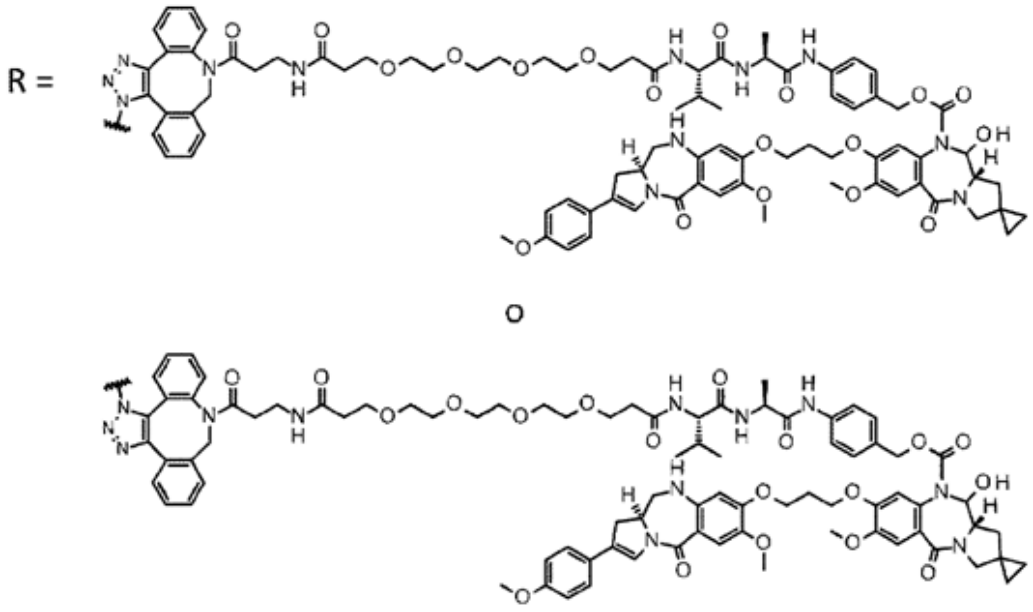
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,63 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 9,80 mg (98 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0850]

Ejemplo 105: ADC39

[Fórmula 232]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 105 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0851]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 14 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

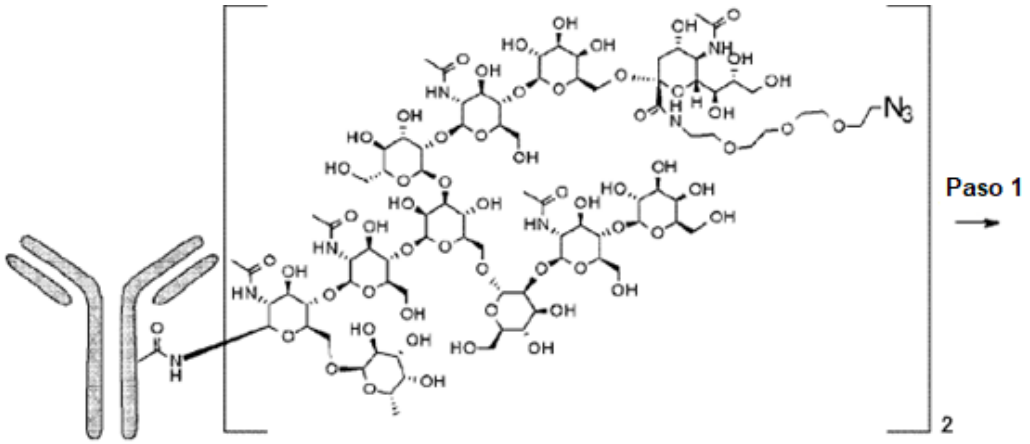
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,72 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 10,3 mg (cuantitativo), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

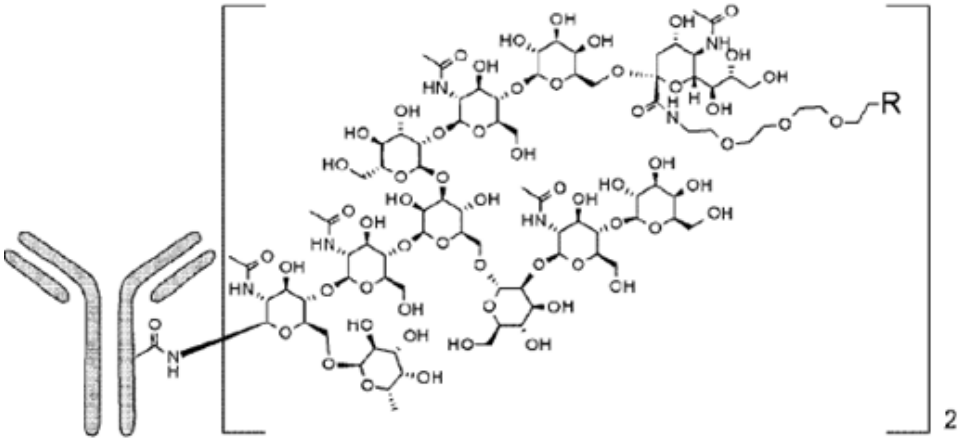
[0852]

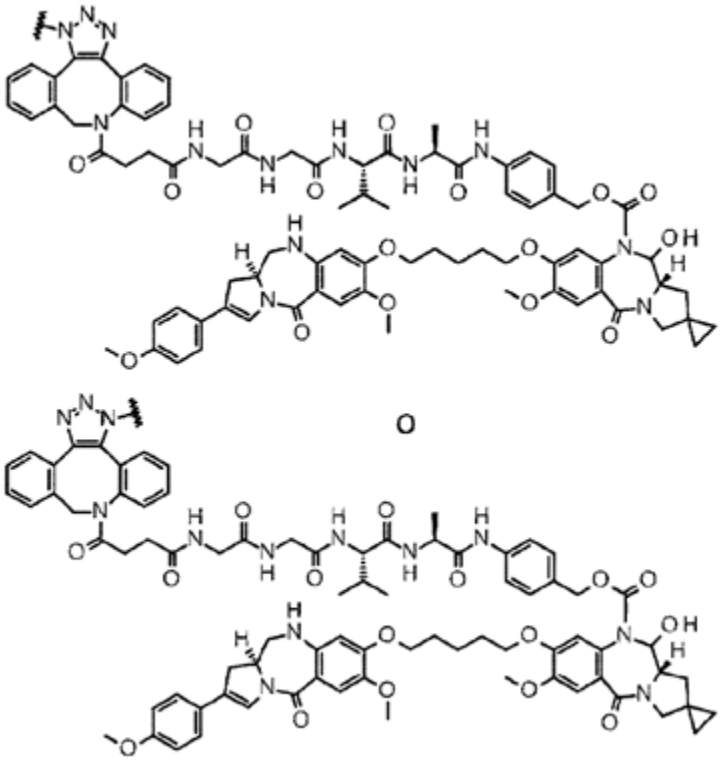
Ejemplo 106: ADC40

[Fórmula 233]




Anti-CLDN6(H1L1)−(MSG1−$N_3$)$_2$



R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 106 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0853]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 2,50 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 61, se añadieron 1,2-propanodiol (0,229 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,206 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 14,5 mL de una solución del compuesto deseado.

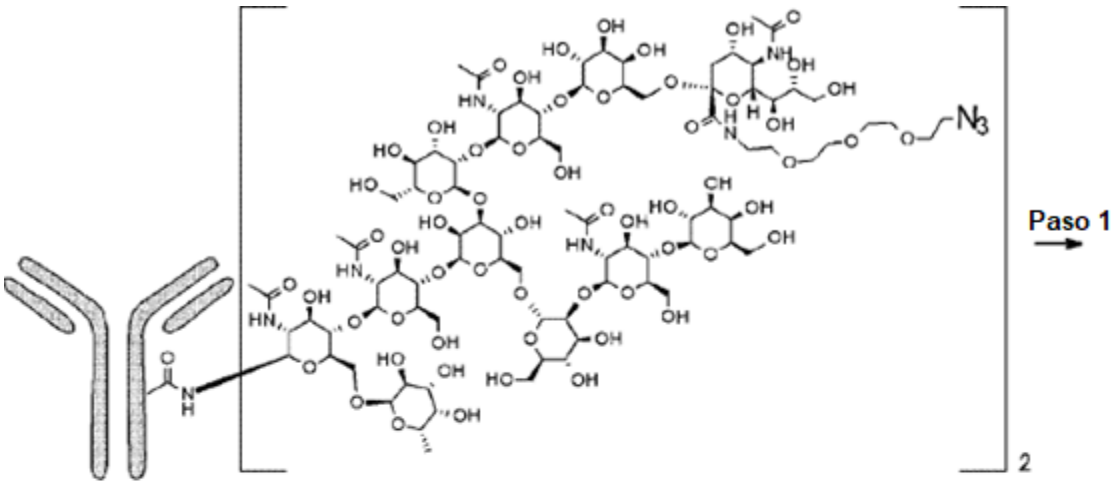
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,54 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 22,3 mg (89 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

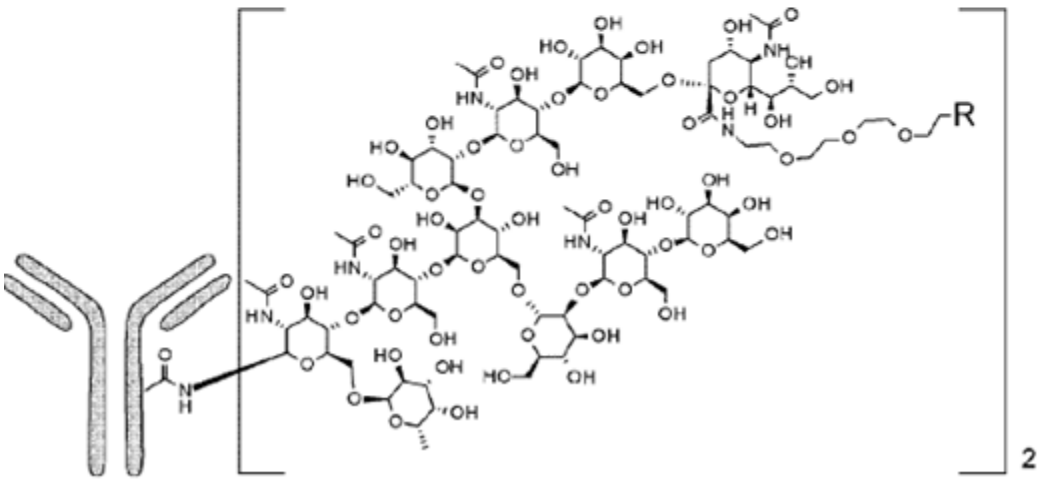
[0854]

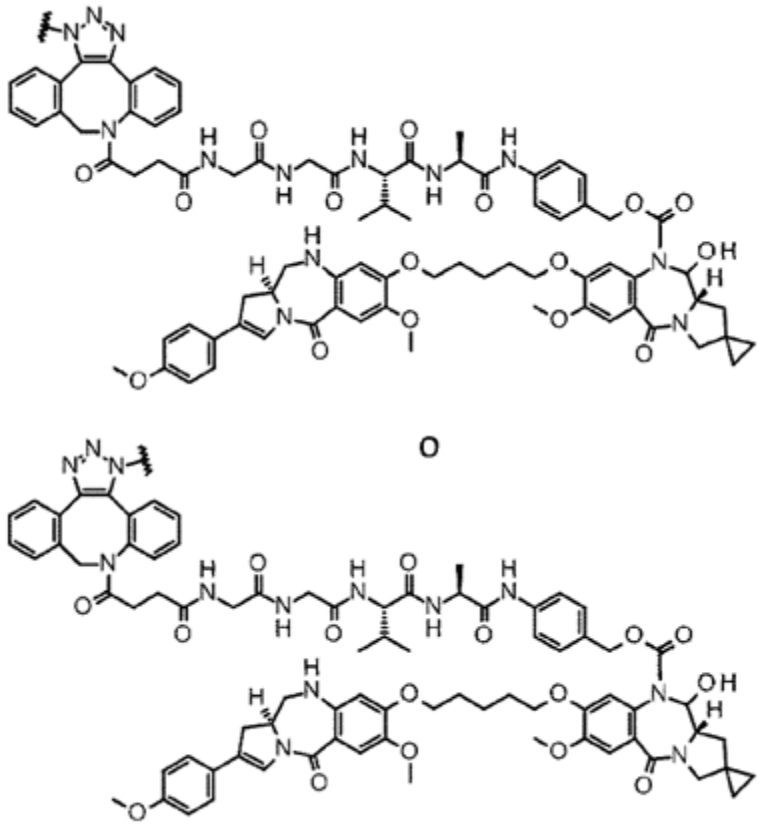
Ejemplo 107: ADC41

[Fórmula 234]




Anti-CLDN6(H2L2)—(MSG1-$N_3$)$_2$



R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 107 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0855]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,96 mg/mL, 2,50 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 62, se añadieron 1,2-propanodiol (0,229 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,206 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

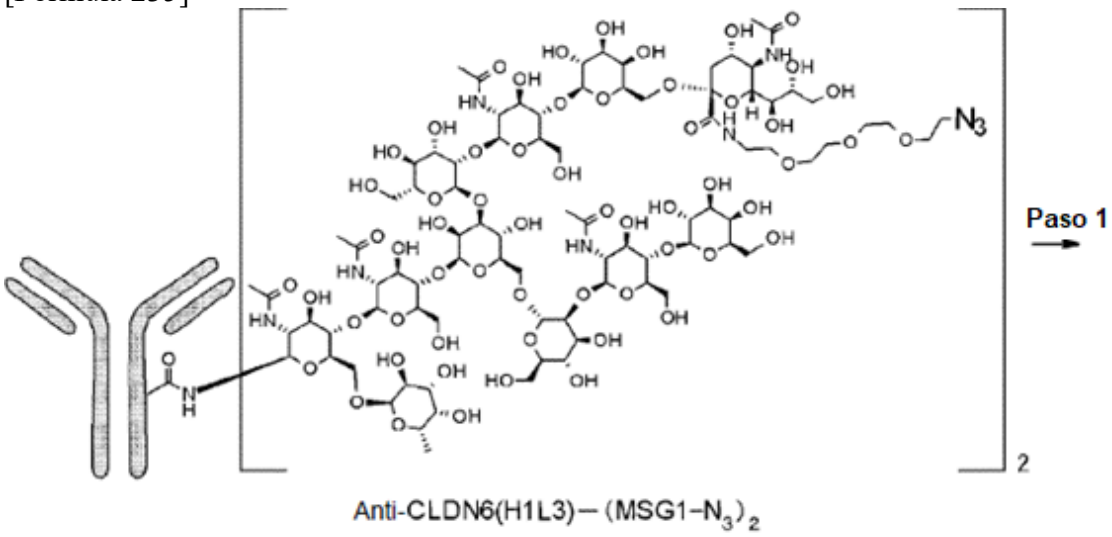
Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 14,5 mL de una solución del compuesto deseado. Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

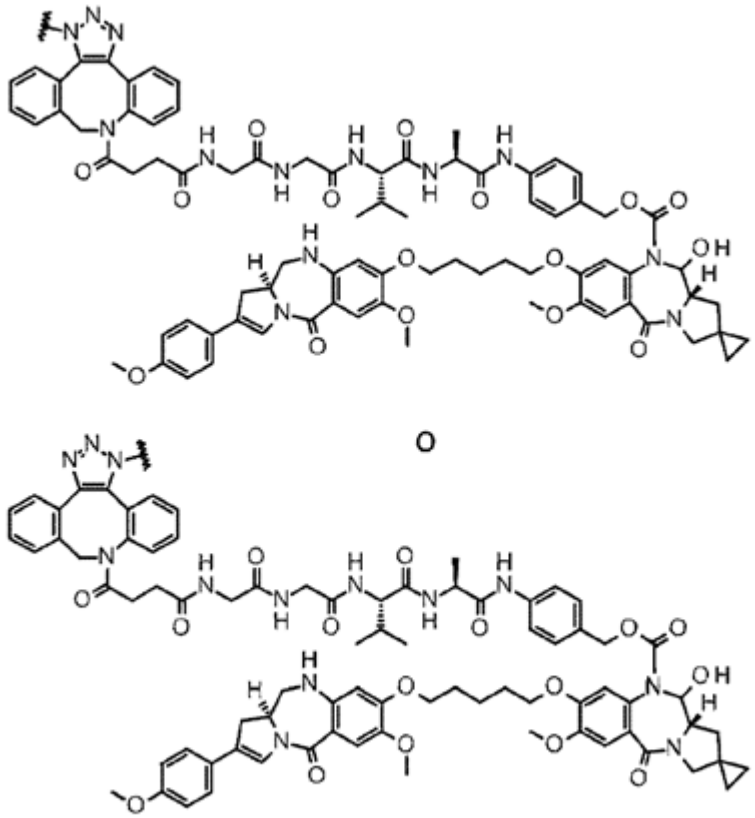
Concentración de anticuerpos: 1,52 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 22,0 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0856]

Ejemplo 108: ADC42

[Fórmula 235]



R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 108 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0857]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,83 mg/mL, 2,50 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 63, se añadieron 1,2-propanodiol (0,229 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,206 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 14,5 mL de una solución del compuesto deseado.

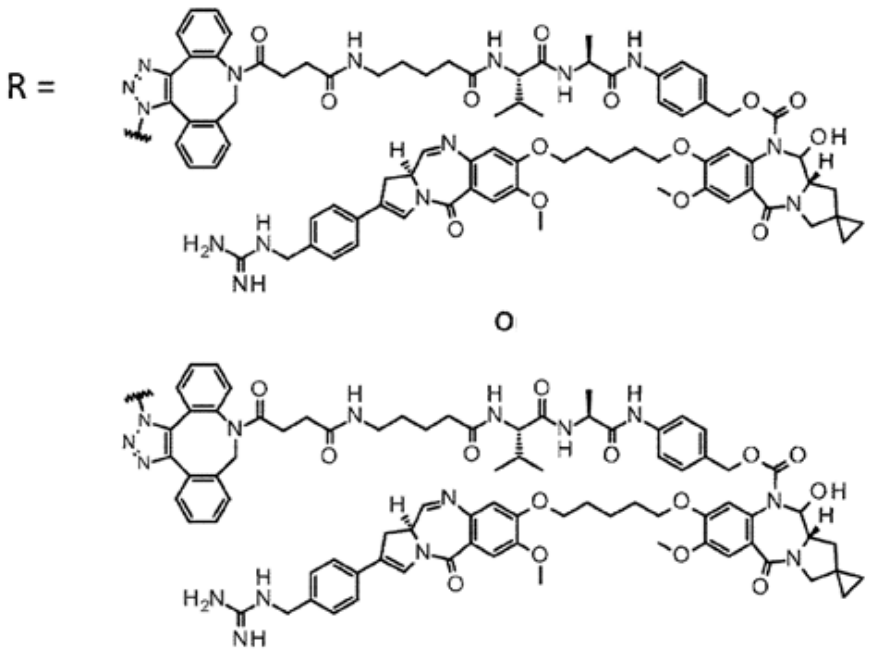
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,45 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 21,0 mg (84 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0858]

Ejemplo 109: ADC43

[Fórmula 236]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 109 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0859]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 16 del Ejemplo 42 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el

resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 3,0 mL de una solución del compuesto deseado.

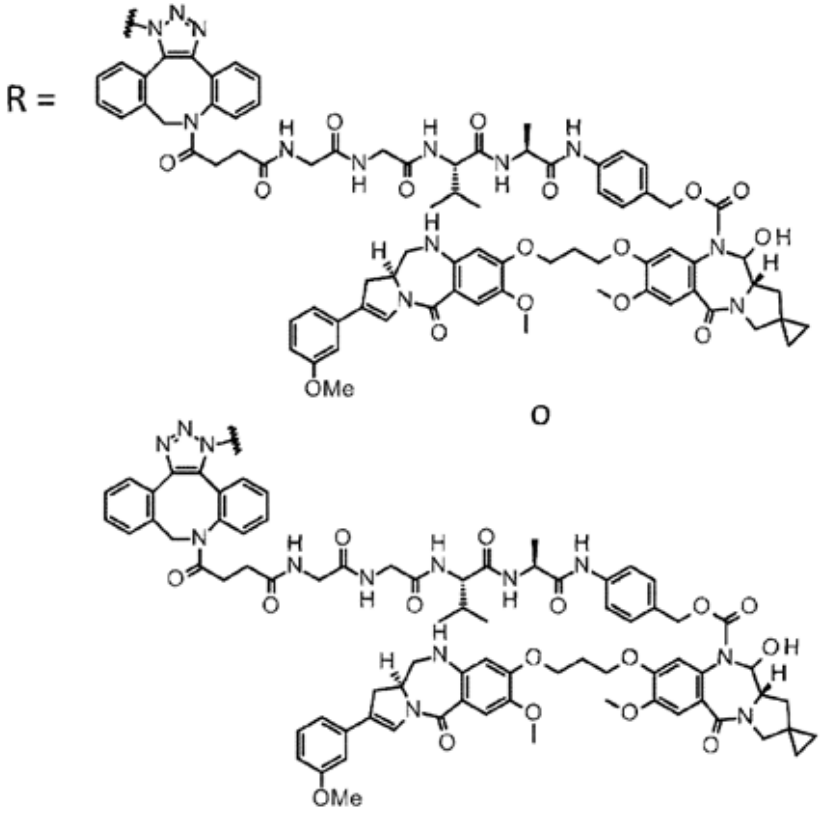
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,30 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 7,79 mg (78 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0860]

Ejemplo 110: ADC44

[Fórmula 237]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 110 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0861]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 43 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

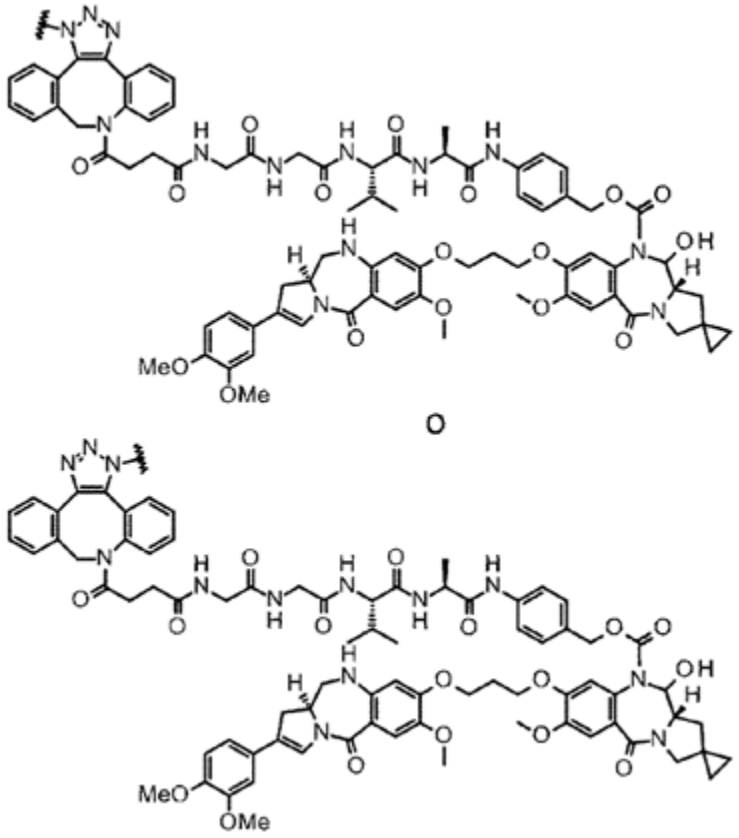
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 0,93 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 5,58 mg (56 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0862]

Ejemplo 111: ADC45

[Fórmula 238]

R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 111 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0863]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 44 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,0 mL de una solución del compuesto deseado.

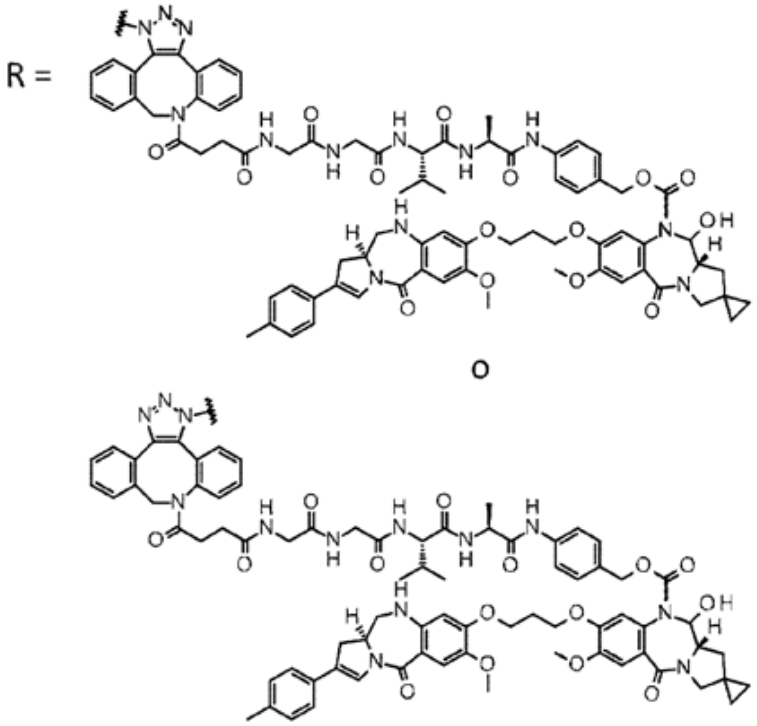
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 0,99 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 5,95 mg (59 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0864]

Ejemplo 112: ADC46

[Fórmula 239]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 112 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0865]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una

solución de 10 mM de dimetilsulfóxido del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 31 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente por 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

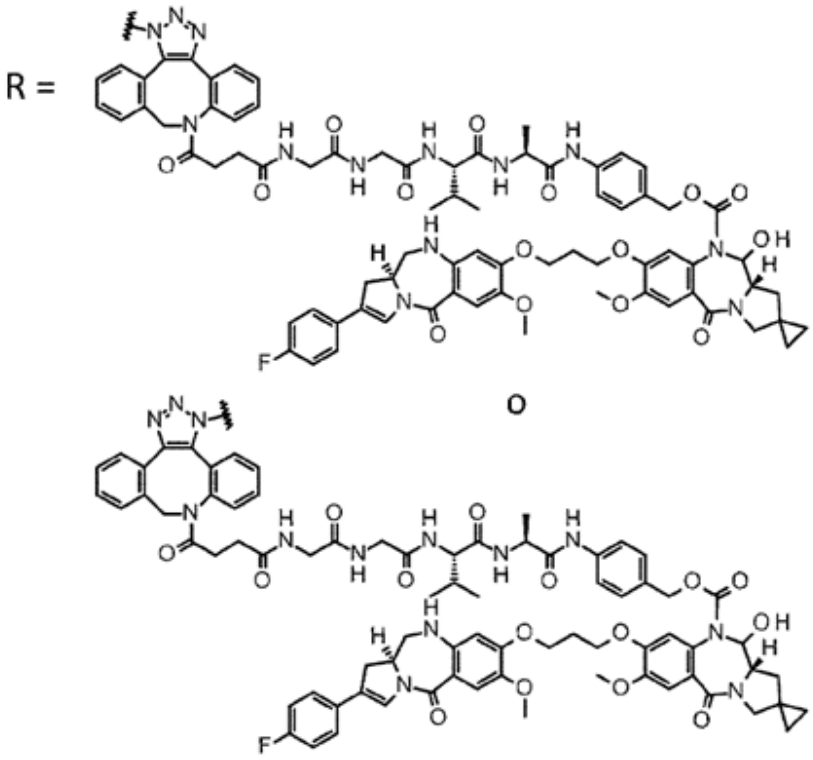
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,49 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,94 mg (89 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0866]

Ejemplo 113: ADC47

[Fórmula 240]



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 113 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0867]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 32 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

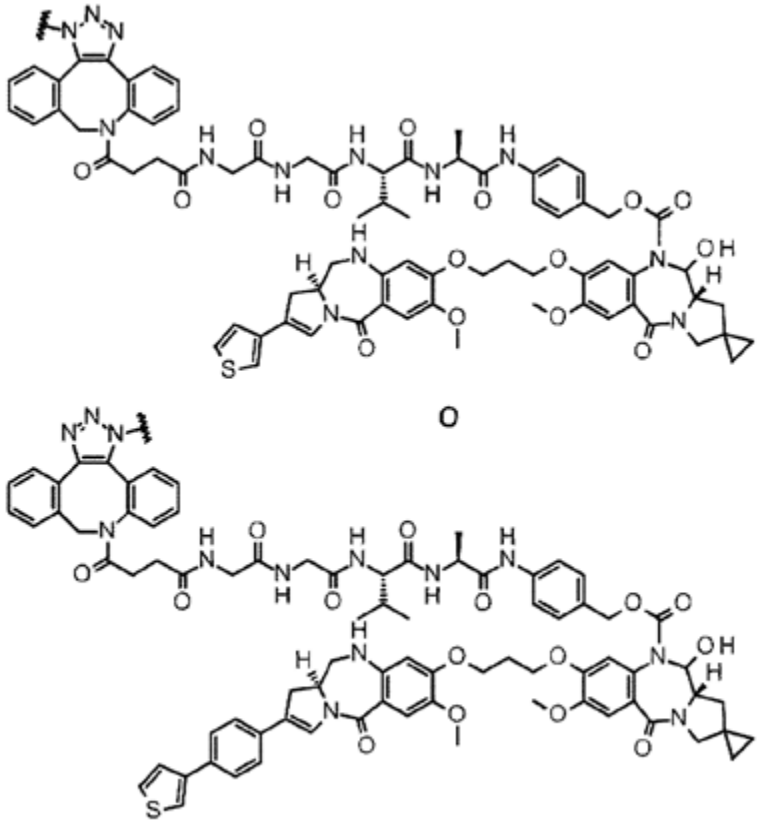
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,45 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,73 mg (87 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0868]

Ejemplo 114: ADC48

[Fórmula 241]

R = 

o 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 114 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0869]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 8 del Ejemplo 33 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

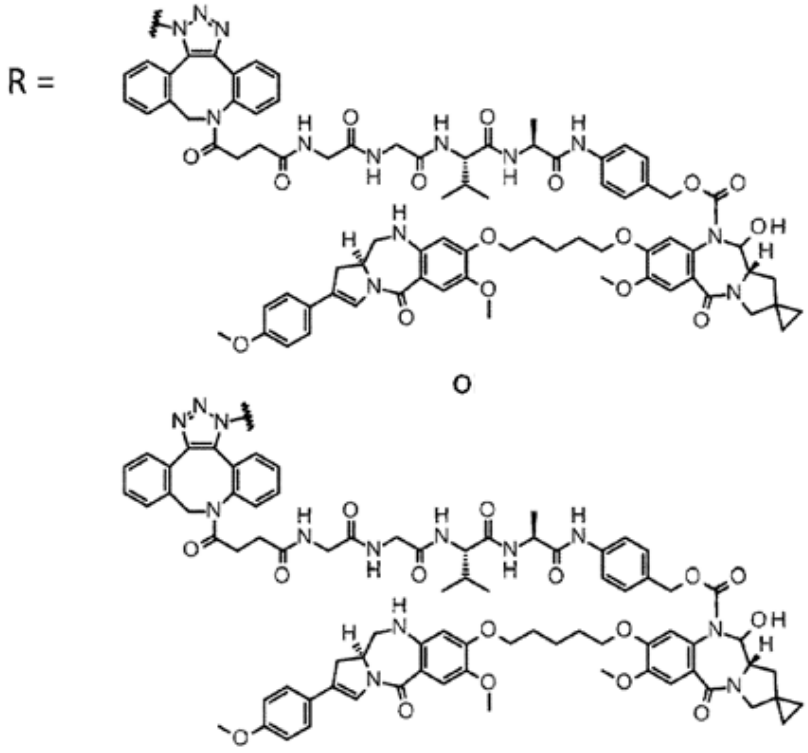
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,45 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,70 mg (87 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

[0870]

Ejemplo 115: ADC49

[Fórmula 242]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 115 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0871]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,0825

mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

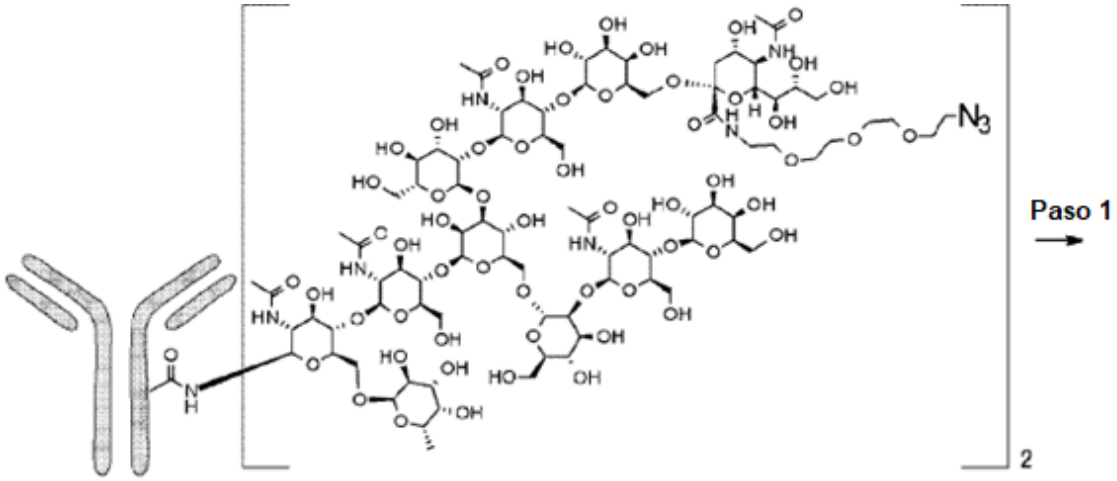
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,41 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,45 mg (85 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

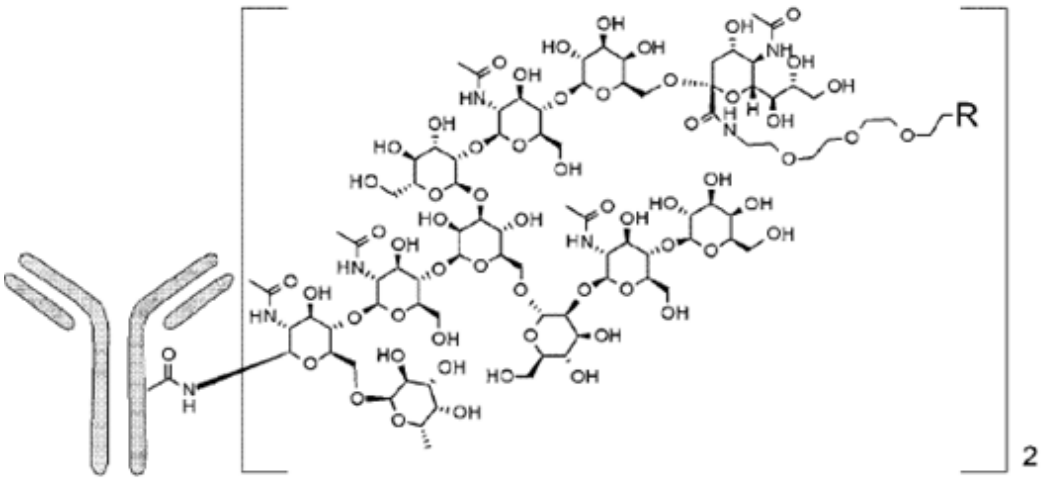
[0872]

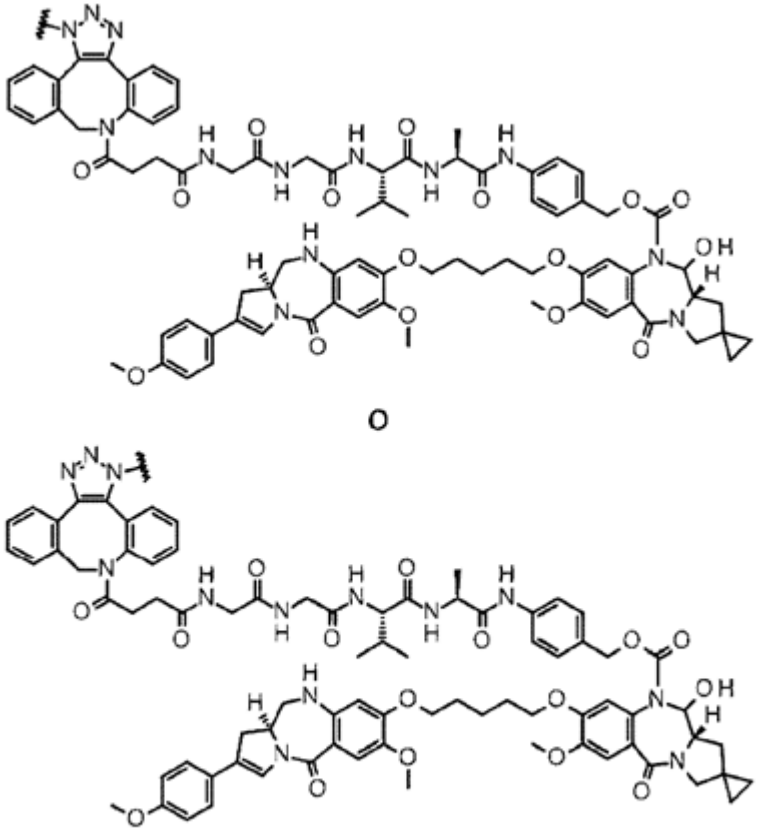
Ejemplo 116: ADC50

[Fórmula 243]




Anti-Trop2－(MSG1-$N_3$)$_2$



R = 

o 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 116 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0873]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 65, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

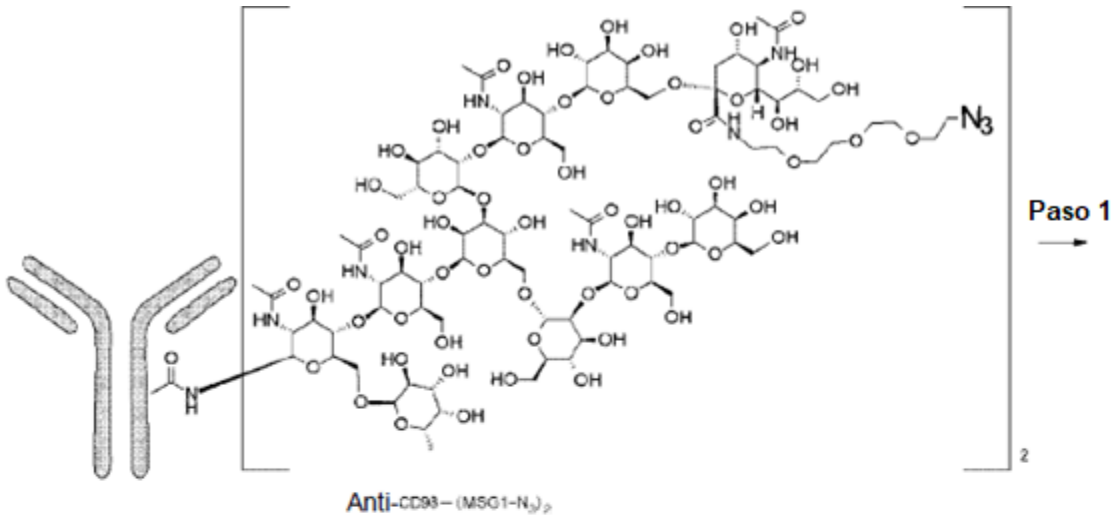
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

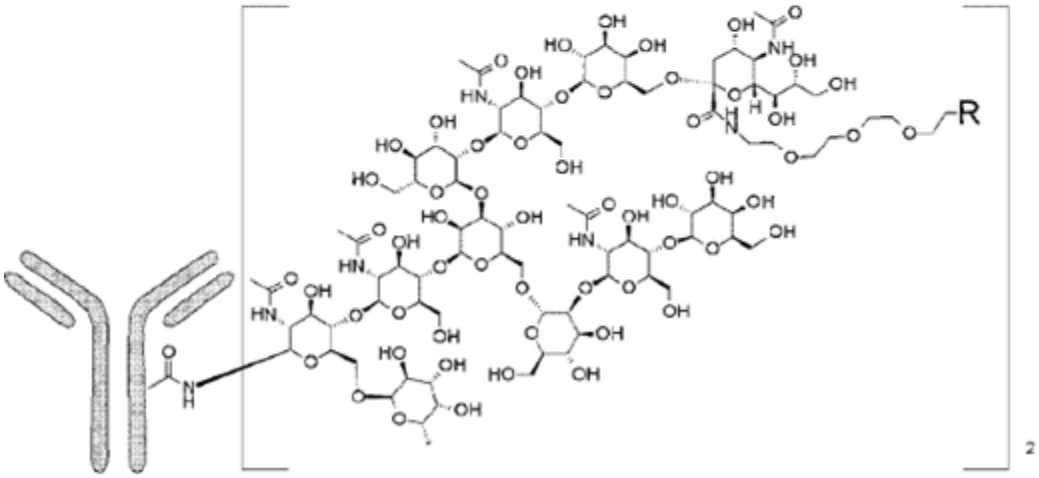
Concentración de anticuerpos: 1,47 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,8 mg (88 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,9

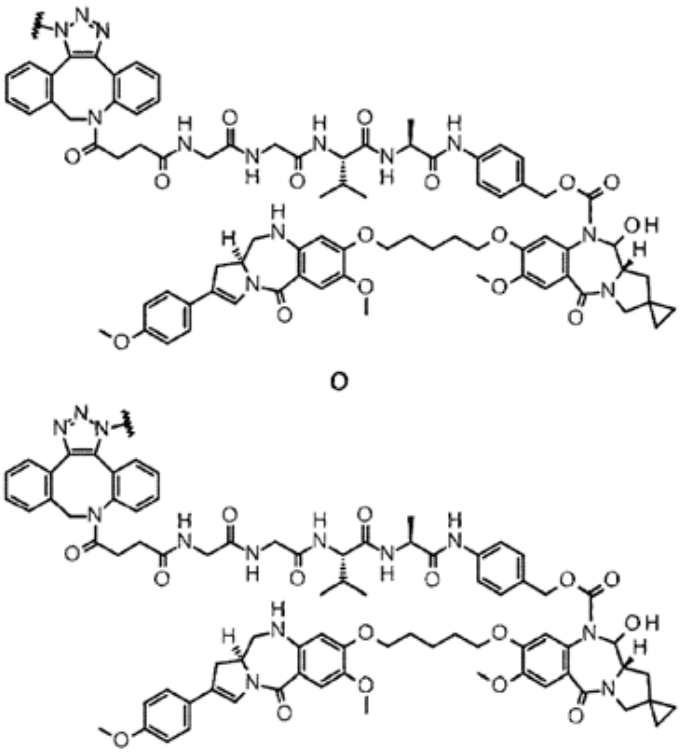
[0874]

Ejemplo 117: ADC51

[Fórmula 244]



R = 

(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 117 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0875]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,2 mg/mL, 1,00 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 64, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

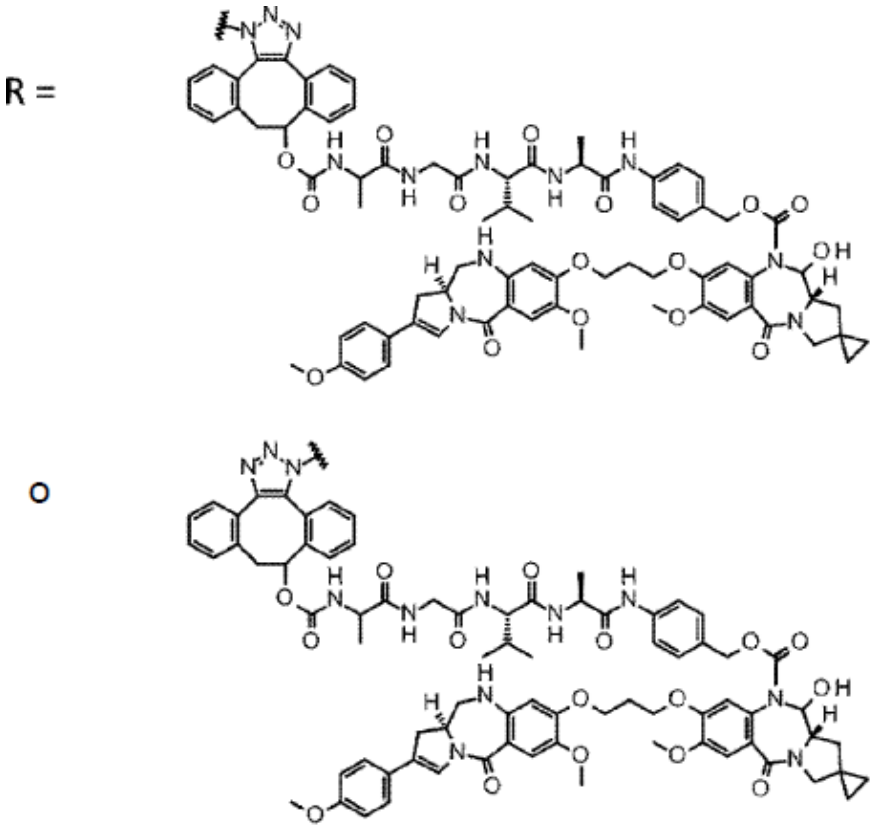
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,36 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,19 mg (82 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0876]

Ejemplo 118: ADC52

[Fórmula 245]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 118 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0877]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 60, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 2 del Ejemplo 8 (0,0825

mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 3 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6,00 mL de una solución del compuesto deseado.

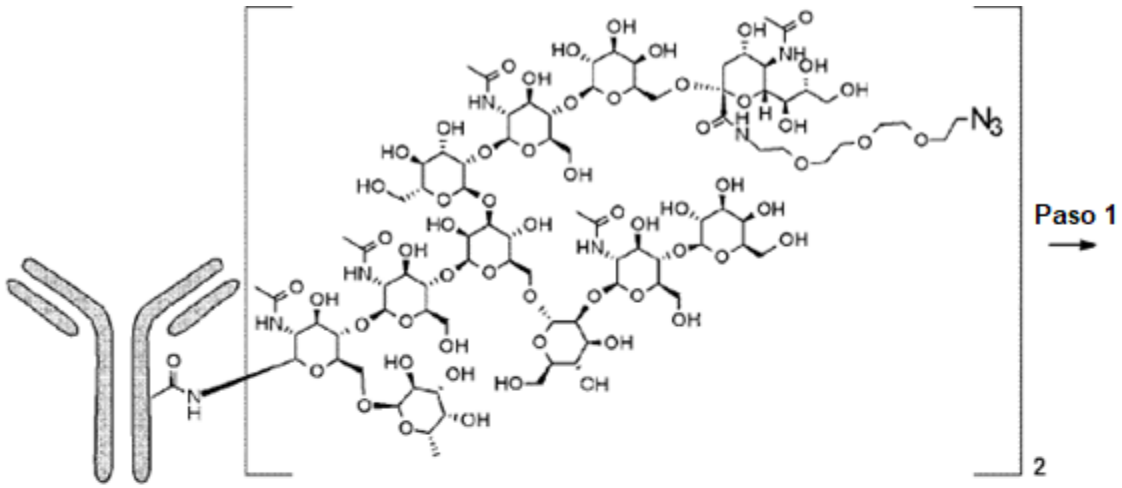
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,06 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 6,35 mg (63 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,2

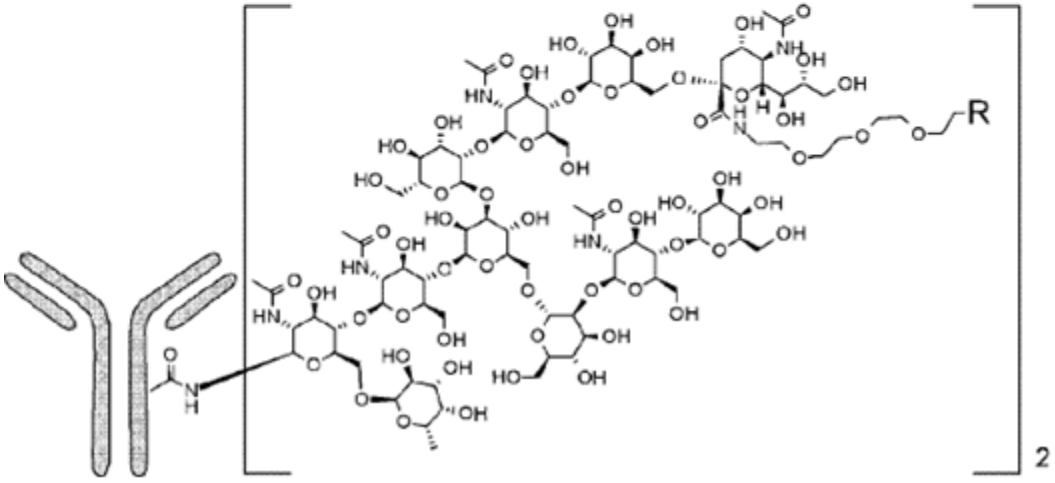
[0878]

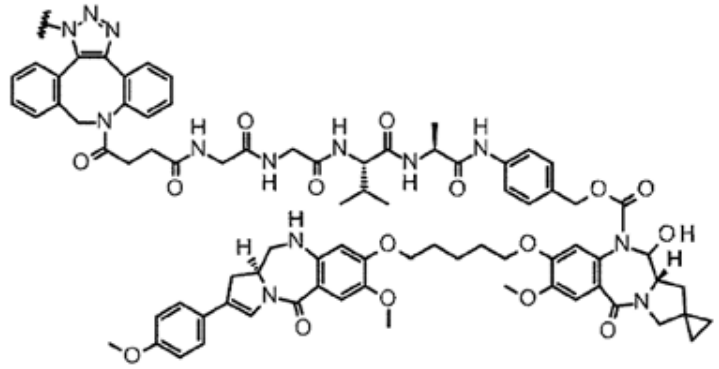
Ejemplo 119: ADC53

[Fórmula 246]

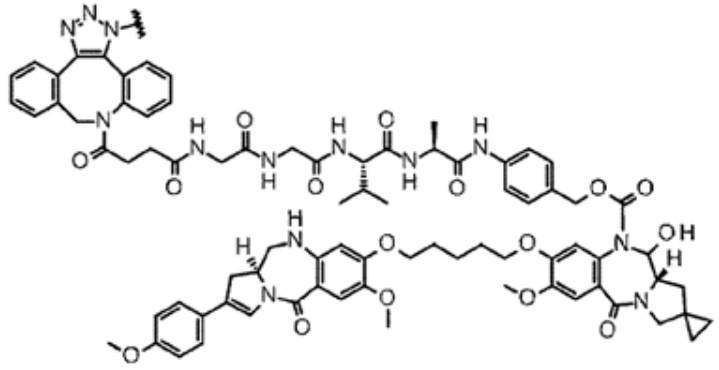



Anti-LPS－(MSG1-$N_3$)$_2$



R = 

o



(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 119 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0879]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (9,89 mg/mL, 0,40 ml) obtenido en el paso 2 del Ejemplo 66, se añadieron 1,2-propanodiol (0,367 ml) y una solución de dimetil sulfóxido de 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,0328 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubo (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente durante 2 días.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 2,50 mL de una solución del compuesto deseado.

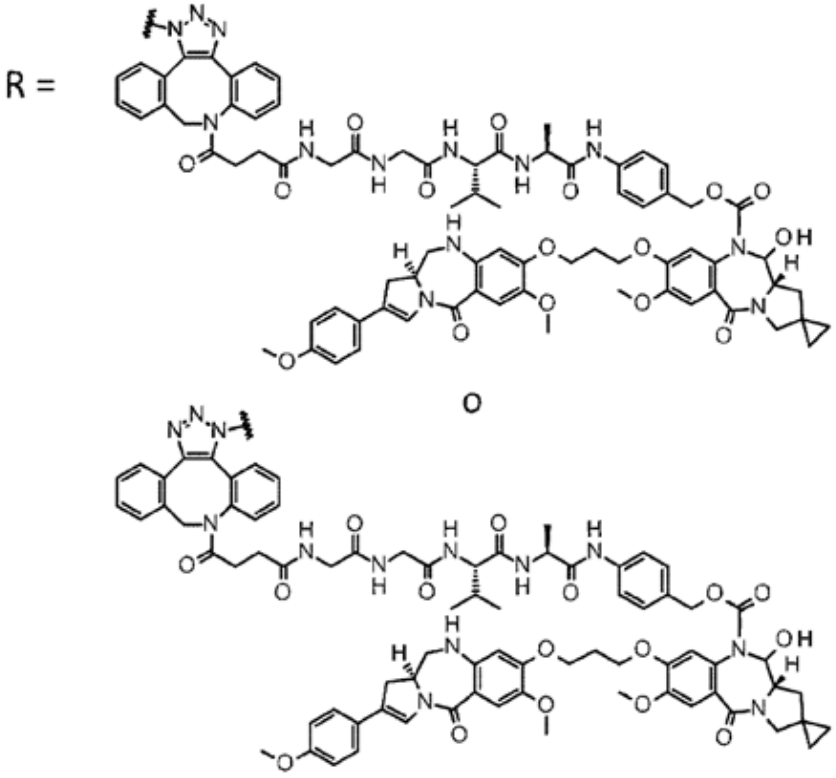
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,16 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 2,89 mg (72 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0880]

Ejemplo 120: ADC54

[Fórmula 247]




(El anillo de triazol que se formará en el paso 1 tiene isómeros geométricos, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 120 tiene un enlazador como mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

[0881]

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) del anticuerpo (10,0 mg/mL, 1,00 mL) obtenido en el paso 1 del Ejemplo 59, se añadieron 1,2-propanodiol (0,917 mL) y una

solución de 10 mM de dimetilsulfóxido del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 4 (0,0825 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar usando un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) a temperatura ambiente por 48 horas.

Operación de purificación: La solución se purificó usando la operación común D para proporcionar 6 mL de una solución del compuesto deseado.

Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.

Concentración de anticuerpos: 1,49 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 8,94 mg (89 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0882]

Ejemplo 121: Efecto anticelular del fármaco inmunoconjugado (1)

La NCI-N87 (American Type Culture Collection; ATCC CRL-5822), una línea celular de cáncer gástrico humano de las células HER2 antígeno positivo se cultivó en el medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific; en lo sucesivo, denominado medio RPMI) que contiene 10 % de suero bovino fetal (Hyclone). La MDA-MB-468 (ATCC HTB-132), células HER2 antígeno negativas, se cultivó en el medio L-15 de Leibovitz (Thermo Fisher Scientific; en lo sucesivo, medio de Leibovitz) que contiene 10 % suero bovino fetal (Hyclone). Las células NCI-N87 y MDA-MB-468 se prepararon con medio RPMI y con medio de Leibovitz, respectivamente, para alcanzar $2,5 \times 10^4$ células/mL, y se añadieron porciones de 80 μl de ellas a una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos. Después de añadir las células, se cultivó la NCI-N87 a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante la noche, y la MDA-MB-468 se cultivó a 37 °C durante la noche, sin establecer la concentración de $CO_2$.

Al día siguiente, porciones de 20 μL de un fármaco inmunoconjugado anti-HER2 diluido con medio RPMI o medio de Leibovitz de 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM y 0,001 nM se añadieron a la microplaca. A cada pocillo sin ningún fármaco inmunoconjugado, se añadieron 20 μl de medio RPMI o medio de Leibovitz. La NCI-N87 se cultivó a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 6 días, y se cultivó la MDA-MB-468

a 37 °C durante 6 días, sin establecer la concentración de $CO_2$. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió el Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes CellTiter-Glo (Promega Corporation) en una cantidad equivalente a la de la solución de cultivo, y se agitó usando un mezclador de placas. La microplaca se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se midió la cantidad de emisión utilizando un lector de placas (PerkinElmer). Las tasas de supervivencia celular se calcularon utilizando la siguiente fórmula.

Tasa de supervivencia celular (%) = a ÷ b × 100

a: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con sustancia de prueba b: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con medio

Los valores $IC_{50}$ se calcularon utilizando la siguiente fórmula.

$IC_{50}$ (nM) = antilog((50-d) × ($LOG_{10}$(b)-$LOG_{10}$(a)) ÷ (d-c) + $LOG_{10}$(b))

a: Concentración de la sustancia de prueba, a b: Concentración de la sustancia de prueba, b

c: Tasa de supervivencia celular cuando se añadió la sustancia de prueba de concentración *a* d: Tasa de supervivencia celular cuando se añadió la sustancia de prueba de concentración b a y b satisface a > b en puntos que intercalan una tasa de supervivencia celular del 50 %.

Cada uno de los fármacos inmunoconjugados ADC17, ADC18, ADC1, ADC54, ADC20, ADC34, ADC23, ADC24 y ADC25 exhibieron un efecto anticelular de $IC_{50}$ < 0,001 (nM) en las células NCI-N87. Cada uno de los fármacos inmunoconjugados ADC26, ADC27, ADC16, ADC11, ADC12, ADC2, ADC3, ADC4, ADC43, ADC5, ADC21, ADC48, ADC44, ADC6, ADC7, ADC28, ADC29, ADC13, ADC14, ADC30, ADC31, ADC32, ADC33, ADC35, ADC36, ADC8, ADC9, ADC38, y ADC39 exhibieron un efecto anticelular de 0,001 ≤ $IC_{50}$ < 0,1 (nM).

Ninguno de los fármacos inmunoconjugados exhibieron efecto anticelular en las células MDA-MB-468 ($IC_{50}$ > 0,1 (nM)).

[0883]

Ejemplo 122: Efecto anticelular del fármaco inmunoconjugado (2)

La NCI-N87 (American Type Culture Collection; ATCC CRL-5822), una línea celular de cáncer gástrico humano de las células HER2 antígeno positivo se cultivó en el medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific; en lo sucesivo, denominado medio RPMI) que contiene 10 % de suero bovino fetal (Hyclone). La JIMT-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH; DSMZ ACC 589), una línea celular de cáncer de mama humano de células HER2 antígeno positivo, se cultivó en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (Thermo Fisher Scientific; en lo sucesivo, medio DMEM) que contenía 10 % de suero fetal bovino (Hyclone). Las células NCI-N87 se prepararon con el medio RPMI para alcanzar 5,0 × 104 células/mL y las células JIMT-1 se prepararon con el medio DMEM para alcanzar 1,3 $\times 10^4$ células/mL, y se agregaron porciones de 80 μL de ellas a una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos, y las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante la noche.

Al día siguiente, porciones de 20 μL del fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 o fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 diluido con medio RPMI o medio DMEM a 400 nM, 80 nM, 16 nM, 3,2 nM, 0,64 nM, 0,13 nM, 0,026 nM, 0,0051 nM y 0,0010 nM se añadieron a la microplaca. A cada pocillo sin ningún fármaco inmunoconjugado, se añadieron 20 μl de medio RPMI o medio DMEM. Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se añadió el Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes CellTiter-Glo (Promega Corporation) en una cantidad equivalente a la de la solución de cultivo, y se agitó usando un mezclador de placas.

La microplaca se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se midió la cantidad de emisión utilizando un lector de placas (PerkinElmer). Las tasas de supervivencia celular se calcularon utilizando la siguiente fórmula.

Tasa de supervivencia celular (%) = a ÷ b × 100

a: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con sustancia de prueba

b: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con medio

Los valores IC50 se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50\text{-}d) \times (LOG_{10}(b)\text{-}LOG_{10}(a)) \div (d\text{-}c) + LOG_{10}(b))$

a: Concentración de la sustancia de prueba, a b:

Concentración de la sustancia de prueba, b

c: Tasa de supervivencia celular cuando se agregó la sustancia de prueba de concentración a

d: Tasa de supervivencia celular cuando se añadió la sustancia de prueba de concentración b, a y b satisface a > b en puntos que intercalan una tasa de supervivencia celular del 50 %.

El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 exhibió un efecto anticelular de 0,001 < $IC_{50}$ < 0,1 (nM) en las células NCI-N87 y JIMT-1. El fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 no mostró, por el contrario, ningún efecto anticelular en ambas células ($IC_{50}$ > 0,1 (nM)).

[0884]

Ejemplo 123: Efecto anticelular del fármaco inmunoconjugado (3)

La OV-90 (ATCC CRL-11732), una línea celular de cáncer de ovario humano de células CLDN6 antígeno positivo, se cultivó en el medio mixto 1:1 (en lo sucesivo, el medio) de Medium199 (Thermo Fisher Scientific) y Medio MCDB 105 (Sigma-Aldrich Co. LLC) que contiene 15 % de suero fetal bovino (Hyclone). Las células OV-90 se prepararon con el medio para alcanzar 1,9 × $10^4$ células/mL, y se agregaron porciones de 80 µL de ellas a una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos, y las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante la noche.

Al día siguiente, las porciones de 20 µL de los fármacos inmunoconjugados anti-CLDN6 ADC40, ADC41 o ADC42 diluidos con el medio a 50 nM, 10 nM, 2,0 nM, 400 pM, 80 pM, 16 pM, 3,2 pM, 0,64 Se añadieron pM y 0,13 pM a la microplaca.

A cada pocillo sin ningún fármaco inmunoconjugado, se añadieron 20 µl de medio. Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se añadió el Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes CellTiter-Glo (Promega

Corporation) en una cantidad equivalente a la de la solución de cultivo, y se agitó usando un mezclador de placas.

La microplaca se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, la cantidad de emisión se midió utilizando el lector de placas (PerkinElmer). Las tasas de supervivencia celular se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

Tasa de supervivencia celular (%) = a ÷ b × 100

a: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con sustancia de prueba

b: valor medio de las cantidades de emisión de los pocillos con el medio

Los valores $IC_{50}$ se calcularon utilizando la siguiente fórmula.

$IC_{50}(nM) = \text{antilog}((50\text{-}d) \times (LOG_{10}(b)\text{-}LOG_{10}(a)) \div (d\text{-}c) + LOG_{10}(b))$

a: Concentración de la sustancia de prueba, a b:

Concentración de la sustancia de prueba, b

c: Tasa de supervivencia celular cuando se agregó la sustancia de prueba de concentración a

d: Tasa de supervivencia celular cuando se añadió la sustancia de prueba de concentración b, a y b satisface a > b en puntos que intercalan una tasa de supervivencia celular del 50 %.

Cada uno de los fármacos inmunoconjugados anti-CLDN6 ADC40, ADC41 y ADC42 exhibieron un efecto anticelular de $0{,}001 < IC_{50} < 0{,}1$ (nM) en las células OV-90.

[0885]

Ejemplo 124: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (1)

Ratón: Ratones BALB/c nude hembras de cuatro a cinco semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) se habituaron en condiciones libres de patógenos específicos durante 4 a 7 días antes de ser utilizados para el experimento. Los ratones fueron alimentados con gránulos esterilizados (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd.) y se les suministró agua de la llave esterilizada (preparada mediante la adición de 5 a 15 ppm de solución de hipoclorito de sodio).

Ensayo y fórmula de cálculo: En todos los estudios, el eje mayor y el eje menor de un tumor se midieron dos o tres veces por semana utilizando un calibrador digital electrónico

(CD-15CX, Mitutoyo Corp.), y se calculó el volumen del tumor ($mm^3$).

La fórmula de cálculo se muestra a continuación:

Volumen tumoral (mm3) = Eje mayor (mm) × [Eje menor (mm)] 2 × 1/2

Cada uno de los fármacos inmunoconjugados y anticuerpos se diluyó con tampón de acetato 10 mM, sorbitol al 5 %, pH de 5,5 (NACALAI TESQUE, INC.; tampón ABS) y se administró un volumen líquido de 10 mL/kg en la vena de la cola. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

Se suspendieron células NCI-N87 (ATCC CRL-5822) en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y se trasplantaron subcutáneamente $1 \times 10^7$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 7. El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC26, ADC19 o ADC54 se administró en la vena de la cola el día 7 en una dosis de 0,3 mg/kg para el ADC26 y en una dosis de 1 mg/kg para el ADC19 y el ADC54. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 4 muestra los resultados. Se descubrió que los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 ADC26, ADC19 y ADC54 tienen un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. No se encontró pérdida de peso para ninguno de los ratones con la administración de cualquiera de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2.

En los siguientes ejemplos de evaluación relacionados con la prueba antitumoral, se llevó a cabo el método utilizado en el presente ejemplo de evaluación, a menos que se indique lo contrario.

[0886]

Ejemplo 125: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (2)

Se suspendieron células NCI-N87 (ATCC CRL-5822) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich Co. LLC), y se trasplantaron subcutáneamente $1 \times 10^7$ células al costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron agrupados al azar en el día 4. El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49, el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab (Ejemplo de referencia 3), o el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 se administró en la vena de la cola el día 4 en una dosis de 0,33 mg/kg para todos los casos. Como grupo de control (grupo de vehículos), el

tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 5 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. Por el contrario, el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab y el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 no suprimieron el crecimiento tumoral. No se encontró pérdida de peso en los ratones causada por la administración del fármaco inmunoconjugado ADC49 o del ADC53, ni del anticuerpo anti-HER2.

[0887]

Ejemplo 126: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (3)

Las células KPL-4 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School, British Journal of Cancer, (1999) 79(5/6) 707 -717) se suspendieron células en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich Co. LLC), y se trasplantaron subcutáneamente 1,5 ×107 células al costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron agrupados al azar en el día 14. El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49, el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53, o el trastuzumab tesirina (Ejemplo de Referencia 1) se administró en la vena de la cola el día 14 en una dosis de 0,4 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 6 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor.

Por el contrario, no se encontró regresión del tumor para el ADC53 y el trastuzumab tesirina. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC49 o de trastuzumab tesirina para los ratones.

[0888]

Ejemplo 127: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (4)

Se suspendieron células JIMT-1 (DSMZ ACC 589) en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y se trasplantaron subcutáneamente $5 \times 10^6$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 10. El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 o el trastuzumab

tesirina (Ejemplo de Referencia 1) se administró en la vena de la cola el día 10 en una dosis de 0,4 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 7 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. Para el trastuzumab tesirina, por el contrario, se encontró efecto antitumoral pero no se encontró regresión del tumor. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC49 o de trastuzumab tesirina para los ratones.

[0889]

Ejemplo 128: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (5)

Se suspendieron células OV-90 (ATCC CRL-11732) en Matrigel (Corning Incororated), y se trasplantaron subcutáneamente $2,5 \times 10^6$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 15.

El fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 o el anticuerpo anti-CLDN6 tesirina (H1L1) se administró en la vena de la cola el día 15 en una dosis de 0,33 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 8 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. Por el contrario, no se encontró regresión del tumor para el anticuerpo anti-CLDN6 tesirina (H1L1). No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC40 o de tesirina H1L1 para los ratones.

[0890]

Ejemplo 129: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (6)

Se suspendieron células NIH:OVCAR-3 (ATCC HTB-161) en Matrigel (Corning Incororated), y se trasplantaron subcutáneamente $1 \times 10^7$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 25.

El fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 o el anticuerpo anti-CLDN6 - tesirina (H1L1) se administró en la vena de la cola el día 25 en una dosis de 0,33 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 9 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-CLDN6 ADC40 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. Para la tesirina H1L1, por el contrario, se encontró efecto antitumoral pero no se encontró regresión del tumor.

No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC40 o de tesirina H1L1 para los ratones.

[0891]

Ejemplo 130: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado (7)

Se suspendieron células FaDu (ATCC HTB-43) en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y se trasplantaron subcutáneamente $3 \times 10^6$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 10. El fármaco inmunoconjugado anti-TROP2 ADC50 o el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 se administró en la vena de la cola el día 10 en una dosis de 0,4 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 10 muestra los resultados. Se descubrió que el fármaco inmunoconjugado anti-TROP2 ADC50 tiene un fuerte efecto antitumoral que causa la regresión del tumor. Por el contrario, el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 no suprimió el crecimiento tumoral. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC50 o ADC53 para los ratones.

[0892]

Ejemplo 131: Hibridoma productor de anticuerpos B1 anti-CLDN6 de ratón (218B1)

El hibridoma productor de anticuerpos C7 anti-CLDN6 de ratón (218C7)

131-1. Inmunización de ratones y adquisición de hibridomas 1-1)

Preparación de células para inmunización de ratones

En medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640) FBS (suero fetal

bovino) al 10 % (+) (10 mL o 20 mL), $2 \times 10^6$ o $5 \times 10^6$ células NOR-P1 (línea celular de cáncer de páncreas humano, RIKEN RCB -2139) se cultivaron durante 5 días y luego se recogieron y se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se resuspendieron en PBS (300 μl).

1-2) Inmunización de ratones

Cada uno de los ratones BALB/c (12 semanas de edad) se inmunizó intraperitonealmente con células NOR-P1 (células $2 \times 10^6$) en intervalos de aproximadamente 1 semana para la primera a la quinta inmunización.

Aproximadamente 2 semanas después de la quinta inmunización, cada ratón BALB/c se inmunizó intraperitonealmente con células NOR-P1 ($5 \times 10^6$ células).

Aproximadamente 3 semanas después de la quinta inmunización, cada ratón BALB/c se inmunizó intraperitonealmente con células NOR-P1 ($2 \times 10^6$ células). Cada uno de los ratones BALB/c se inmunizó intraperitonealmente con células NOR-P1 $2 \times 10^6$ en intervalos de aproximadamente 2 semanas para la octava a la décima inmunización.

Aproximadamente 3 semanas después de la décima inmunización (11ª inmunización) y 3 días después (12ª inmunización, inmunización final), cada ratón BALB/c se inmunizó intraperitonealmente con $5 \times 10^6$ células NOR-P1. Los esplenocitos se aislaron 3 días después de la inmunización final.

1-3) Preparación de esplenocitos a partir de ratones inmunizados

Se aisló el bazo de cada ratón inmunizado, se trituró y se suspendió en el medio RPMI1640 10 % FBS (+). La suspensión celular se pasó a través de un filtro celular (70 μm, BD Falcon), y luego se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos para descartar el sobrenadante. Se añadió a esto la solución Tris-$NH_4Cl$

(Tris-HCl 20 mM, pH de 7,2, $NH_4Cl$ 77,6 mM; 20 mL), y el resultante se trató a temperatura ambiente durante 5 minutos. A esto se le añadió PBS (20 mL), y el resultante se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de haber descartado el sobrenadante, se añadió el medio RPMI1640 FBS (+) (10 mL) al residuo.

1-4) Preparación de células de mieloma

Se cultivaron células P3U1 (línea celular de mieloma de ratón) en el medio RPMI1640 FBS (+) durante 5 días, y luego se recogieron y resuspendieron en el medio RPMI1640 FBS (+) (20 mL).

1-5) Fusión celular

Los esplenocitos y las células de mieloma fueron mezcladas 5:1 y se centrifugaron a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células se lavaron dos veces con el medio RPMI1640 FBS (-) (10 mL) y luego se centrifugaron (1500 rpm, 5 minutos).

El grupo de células en la fracción precipitada obtenida se aflojó lo suficiente, y luego se le añadió gradualmente polietilenglicol-1500 (PEG-1500; 1 mL) con agitación durante aproximadamente 1 minuto. Después de agitar durante 3 minutos y 30 segundos, el resultante se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 segundos. Posteriormente, se añadió el medio RPMI 10 % de IgG baja en FBS (+) (10 ml) a la solución celular durante 1 minuto. La suspensión celular se centrifugó (1500 rpm, 5 minutos), y las células en la fracción precipitada obtenida se aflojaron cuidadosamente y luego se suspendieron cuidadosamente en medio el HAT (medio RPMI1640 que contenía FBS con bajo contenido de IgG al 10 %, suplemento de medio HAT y BriClone al 5 % ; 200 ml). La suspensión se dividió en partes alícuotas en una placa de cultivo de 96 pocillos a 200 µl/ pocillo y se cultivó en una incubadora a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 6 días. 1-6) Cribado de hibridomas /preparación de sonda

La DT3C, una proteína compleja recombinante, se produjo con el propósito de analizar la internalización de anticuerpos y la actividad de inmunotoxinas. Esta DT3C

es una proteína formada al fusionar el dominio catalítico de la toxina diftérica (DT) y el dominio de unión a anticuerpos de la proteína estreptocócica G mediante ingeniería genética. DT3C se une específicamente a la región Fc de los anticuerpos e induce la muerte celular a través de la inhibición de la síntesis de proteínas cuando se incorpora a una célula. El uso de este sistema permite la observación simultánea de la internalización de un anticuerpo y el efecto citocida de la inmunotoxina (Yamaguchi, M. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603).

1-7) Cribado de hibridomas con DT3C

A una placa de 96 pocillos, se añadieron 4 μg/mL de DT3C (25 μL), y se añadió adicionalmente el sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido en los pasos 1-5 (25 μL), y el resultante se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células NOR-P1 (50 μL) se sembraron en $2 \times 10^5$ células/mL (medio RPMI 10 % IgG baja de FBS (+)), y se cultivaron en una incubadora de $CO_2$ a 37 °C durante 3 días. A través de observación microscópica posterior al cultivo, se determinó que los pocillos con un número de células adherentes siendo aproximadamente el 25 % o menos al usar un anticuerpo de control negativo fueron positivos. Los clones seleccionados se sometieron a uno o dos pasos de subclonación para establecer ocho líneas celulares de hibridoma monoclonal.

[0893]

131-2: Identificación del antígeno al que se une el anticuerpo producido por el hibridoma

Se identificaron antígenos para dos clones, 218B1 y 218C7, de anticuerpos producidos por los hibridomas preparados en el Ejemplo 131-1.

2-1) Inmunoprecipitación de proteína de superficie celular marcada con biotina con anticuerpo 218B1 y anticuerpo 218C7

Se eliminó el sobrenadante de cultivo de $2 \times 10^6$ células NTERA-2 (línea celular de cáncer testicular humano, ATCC CRL-1973), y el residuo se lavó dos veces con PBS. El EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) se suspendió en PBS a una concentración de 0,1 mg/mL. Después de eliminar PBS, se añadió solución de biotina/PBS, y el resultante se incubó en un agitador durante 30 minutos, y luego se lavó dos veces con solución de glicina/PBS 100 mM (25 mL) y luego se lavó una vez con PBS (10 mL). Las células lavadas se resuspendieron en 200 μl de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH de 7,4, DDM al 1 %, inhibidor de proteasa, libre de EDTA completo (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) 1 partícula/50 ml ), y se trató a 4 °C durante 30 minutos. El resultante se centrifugó (13000 rpm, 20 minutos, 4 °C) para preparar un

lisado celular. Al lisado celular, se añadió tampón de proteína G Sepharose/lisis (suspensión al 50 %; 30 μ L) obtenido al sustituir el tampón de Protein G Sepharose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare)) con el tampón de lisis, y el resultante se hizo girar a 4 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 4 °C durante 1 minuto, y se recogió el sobrenadante. A este sobrenadante se le añadió el anticuerpo 218B1 o el anticuerpo 218C7 (aproximadamente 3 μg), y el resultante se hizo girar a 4 °C durante 30 minutos, a lo que luego se le añadió Proteína G Sepharose/tampón de lisis (suspensión al 50 %; 60 μ L), y el resultante se hizo girar a 4 °C durante 1 hora. La proteína G Sepharose se lavó seis veces con el tampón de lisis (1 mL) y luego se resuspendió en 1 × tampón de muestra SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Después de que la suspensión se trató a 100 °C durante 5 minutos, la solución se recogió como una muestra para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

2-2) SDS-PAGE y electrotransferencia (Western blotting)

La muestra SDS-PAGE preparada en 2-1) se apiló con SuperSep Ace 5-20 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a 50 mV durante 30 minutos, y luego se sometió a electroforesis a 200 mV durante 1 hora, y se transfirió desde el gel a una membrana a 12 mV durante 47 minutos. La membrana se lavó con PBS-T (PBS (-) - Tween 20 al 0,02 %) y luego se bloqueó durante 1 hora. La membrana se lavó tres veces con PBS-T durante 5 minutos y luego se hizo reaccionar con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare; diluido 2000 veces con PBS-T en uso) durante 1 hora. La membrana se lavó dos veces con PBS-T durante 5 minutos, y luego

se detectó una banda objetivo utilizando un método de quimioluminiscencia mejorada (ECL). Se detectó una banda que indicaba un peso molecular de 18 kDa para cualquiera de los casos con el anticuerpo 218B1 y el caso con el anticuerpo 218C7, independientemente de la presencia o ausencia de DTT añadido.

2-3) Espectrometría de masas del producto inmunoprecipitado de proteína celular con anticuerpo 218B1 y anticuerpo 218C7

Se recogieron $2 \times 10^7$ células NTERA-2 y se lavaron dos veces con PBS. Las

células se recogieron usando un raspador de células y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos.

Después de que se eliminó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 2 mL del tampón de lisis y se trataron a 4 °C durante 30 minutos. El resultante se centrifugó (13000 rpm, 20 minutos, 4 °C) para preparar un lisado celular. La proteína G Sepharose/tampón de lisis (suspensión al 50 %; 180 μ l) se añadió al lisado celular, y el resultante se hizo girar a 4 °C durante 30 minutos y luego se centrifugó a 4 °C durante 1 hora, y se recogió el sobrenadante. El anticuerpo 218B1 (aproximadamente 9 μ g) se añadió al sobrenadante, y el resultante se hizo girar a 4 °C durante 30 minutos, a lo que luego se le añadió Proteína G Sepharose/tampón de lisis (suspensión al 50 %; 180 μ L), y el resultante se hizo girar a 4 °C por 1 hora. La proteína G Sepharose se lavó seis veces con el tampón de lisis (1 mL) y luego se resuspendió en 1 × tampón de muestra SDS. Después de que la suspensión se trató a 100 °C durante 5 minutos, la solución se recogió como una muestra para SDS-PAGE. La SDS-PAGE se llevó a cabo de la misma manera que en 2-2), y el gel de electroforesis se tiñó con CBB. La parte correspondiente a 18 kDa se cortó del gel de electroforesis y se sometió a espectrometría de masas. La espectrometría de masas encontró que la pieza de gel contenía claudina-6.

2-4) análisis FACS

Dado que se estimó que el antígeno para el anticuerpo 218B1 y el anticuerpo 218C7 era la claudina-6 de la espectrometría de masas, se llevó a cabo un análisis de expresión forzada por transfección de ADNc. Los resultados del análisis FACS mostraron que el anticuerpo 218B1 y el anticuerpo 218C7 exhibieron una fuerte reacción positiva para las células CHO-K1 que expresaban claudina-6 humana,

demostrando que el antígeno para el anticuerpo 218B1 y el anticuerpo 218C7 es la claudina-6.

[0894]

Ejemplo 132: Purificación de anticuerpo del sobrenadante de cultivo de hibridoma

El hibridoma productor de anticuerpo B1 anti-CLDN6 de ratón (218B1) y el hibridoma productor de anticuerpo C7 anti-CLDN6 de ratón (218C7) producido en el Ejemplo 131 se cultivaron en Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific) que contenía suero bovino

fetal al 10 %, Ultra- Baja IgG (Thermo Fisher Scientific). El sobrenadante de cultivo se recogió por centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm (producido por Corning Incorporated). El anticuerpo se purificó del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad con rProteína A (de 4 a 6 °C) en un solo paso. El paso de desplazamiento del tampón después de la cromatografía de afinidad con rProteína A se realizó a 4 a 6 °C. Primero, el sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna empaquetada con MabSelectSuRe (producido por GE Healthcare Bioscience) equilibrado con PBS. Después de que la solución de cultivo entró completamente en la columna, la columna se lavó con PBS en una cantidad dos veces o más del volumen de columna. Posteriormente, la elución se realizó con una solución 2 M de hidrocloruro de arginina (pH de 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se sometió a desplazamiento de líquido para el PBS (-) por diálisis (Thermo Scientific, Casete de diálisis Slide-A-Lyzer). Finalmente, la fracción se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo UF VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius AG, a 4 °C) para ajustar la concentración de IgG a 1 mg/mL o más. La fracción se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius AG), y el resultante se usó como una muestra purificada.

[0895]

Ejemplo 133: Evaluación in vitro de anticuerpos B1 y C7 anti-CLDN6 de ratón

133-1: Evaluación de la capacidad de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón mediante citometría de flujo.

La actividad de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón producidos en el Ejemplo 132 para CLDN6 humano y sus moléculas familiares, CLDN3, CLDN4 y CLDN9, se evaluó usando un método de citometría de flujo. Human CLDN3/pCMV6-Entry, human CLDN4/pCMV6-Entry, human CLDN6/pCMV-Entry, human CLDN9/pCMV6-Entry o pCMV6-Entry comprado en OriGene Technologies, Inc. se transfirió transitoriamente a las células 293T (Thermo Fisher Scientific, HCL4517) usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y 5 % de

$CO_2$ durante la noche, y luego se preparó una suspensión celular.
La suspensión de células 293T transfectadas se centrifugó para eliminar el sobrenadante y un anticuerpo anti-CLDN6 de ratón (número de clon: B1 o C7) o un anticuerpo de control de IgG1 de ratón (R&D Systems, Inc.) se añadió y suspendió a una concentración final de 30 μg /mL, 10 μg /mL, 3,3 μg /mL o 1,1 μg /mL, y se dejó reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich Co. LLC) que contenía suero bovino fetal al 5 % (Hyclone) (en lo sucesivo, denominado PBS que contiene FBS al 5 %), y CONJUGADO DE IGG DE CABRA MARCADO CON FLUORESCEÍNA DIRIGIDO A IGG DE RATON (MOLÉCULA COMPLETA).
(MP Biomedicals, Inc.) 500 veces diluido con PBS que contenía FBS al 5 % se añadió luego a las mismas, y las células se suspendieron y se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con PBS que contenía FBS al 5 %, la detección se realizó usando un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter, Inc.). El análisis de los datos se realizó mediante FlowJo (Tree Star, Inc.). Para confirmar cada transfección, las células se permeabilizaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,25 %, y luego se usó un anticuerpo anti-FLAG de ratón (Sigma-Aldrich Co. LLC). La figura 40 muestra los resultados. En cada gráfico de la Figura 40, la ordenada representa la intensidad de fluorescencia FITC que indica la cantidad de anticuerpo de unión y la abscisa representa las concentraciones de anticuerpo. Los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón producidos se unieron a CLDN6 humano y CLDN9 humano en un grado similar, y no se unieron a CLDN3 humano o CLDN4 humano. El IgG1 de control de ratón no se unió a ninguna de las células.
[0896]
133-2: Actividad de internalización de anticuerpos
La actividad de internalización de los anticuerpos B1 y C7 anti-CLDN6 de ratón se evaluó utilizando el reactivo de IgG anti-ratón, al que se había conjugado una toxina que inhibe la síntesis de proteínas (saporina), Mab-ZAP (Advanced Targeting Systems).En esta evaluación, Mab-ZAP se incorpora a las células de una manera que depende de la

actividad de internalización de un anticuerpo anti-CLDN6 de ratón, y la saporina, que inhibe la síntesis de proteínas, se libera en las células para suprimir el crecimiento celular. La JEG-3 (ATCC HTB-36), una línea celular de coriocarcinoma humano de células positivas para CLDN6 humano, NIH: OVCAR-3 (ATCC HTB-161), una línea celular de cáncer humano de ovario de células positivas para CLDN6 humano, o BxPC-3 (ATCC CRL-1687), una línea celular de cáncer de páncreas humano de células negativas para CLDN6 humano, se sembró en una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos a $2 \times 10^3$ células/pocillo, y se cultivó en condiciones de 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante la noche. Al día siguiente, se obtuvo una solución mixta mezclando cada anticuerpo anti-CLDN6 de ratón o anticuerpo IgG1 de ratón (R&D Systems, Inc.) a una concentración final de 1 nM, con Mab-ZAP (concentración final: 0,5 nM) o AffiniPure Cabra Anti-Ratón IgG, Fragmento Specifico Fcγ (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) (concentración final: Se añadió 0,5 nM), sin toxina conjugada, y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 5 días. El número de células sobrevivientes se determinó mediante la cuantificación de la actividad de ATP usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega Corporation). El efecto supresor del crecimiento celular mediante la adición de cada anticuerpo anti-CLDN6 se determinó como una tasa de supervivencia relativa al valor del pocillo sin la solución mixta como 100 %. La figura 41 muestra los resultados.

Se descubrió que los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón (B1, C7) tenían un efecto supresor del crecimiento celular en las líneas celulares positivas para CLDN6 humano JEG-3 y NIH: OVCAR-3. Por otro lado, se descubrió que estos no tienen efecto supresor del crecimiento celular en la línea celular humana negativa para CLDN6 BxPC-3. Se encontró que el anticuerpo IgG1 de ratón no tienen efecto supresor del crecimiento celular en ninguna de las líneas celulares. Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-CLDN6 (B1, C7) producidos tienen actividad de internalización y cada uno es adecuado como anticuerpo para fármacos inmunoconjugados.

[0897]

Ejemplo 134: Secuenciación de nucleótidos de la región variable que codifica el

ADNc de cada uno de los anticuerpos anti-CLDN6 de ratón B1 y C7

134-1 : Secuenciación de nucleótidos de ADNc que codifica la región variable del anticuerpo B1 134-1-1: Preparación de ARN total de hibridoma productor de anticuerpos B1

Para amplificar el ADNc que codifica la región variable del anticuerpo B1, se preparó ARN total a partir del hibridoma productor de anticuerpos B1 usando el reactivo TRIzol (Ambion).

134-1-2 : Amplificación y secuenciación de ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo B1 a través de la PCR 5'-RACE

La amplificación del ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana se llevó a cabo usando aproximadamente 1 μg del ARN total preparado en el Ejemplo 134-1-1 y un Kit SMARTer RACE 5'/3' (Clontech). Como un cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable del gen de la cadena liviana del anticuerpo B1 a través de PCR, UPM (Universal Primer A Mix: unido al kit SMARTer RACE 5'/3') y se utilizó un cebador diseñado sobre la base de la secuencia de una región constante de cadena liviana de ratón conocida.

El ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana amplificada a través de PCR 5'-RACE se clonó en un plásmido, y posteriormente se realizó el análisis de secuencia

para la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo B1 está representada por la SEQ ID NO: 18, y la secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEQ ID NO: 19.

134-1-3 : Amplificación y secuenciación de ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo B1 a través de PCR 5'-RACE

La amplificación del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada se llevó a cabo usando aproximadamente 1 μg del ARN total preparado en el Ejemplo 134-1-1 y un Kit SMARTer RACE 5'/3' (Clontech). Como un cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable del gen de la cadena pesada del anticuerpo LB1 a través de PCR, UPM (Universal Primer A Mix: unido al kit SMARTer RACE 5'/3') y se utilizó un cebador diseñado sobre la base de la secuencia de una región constante de cadena pesada de ratón conocida.

El ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada amplificada a través de PCR 5'-RACE se clonó en un plásmido, y posteriormente se realizó un análisis de secuencia para la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo B1 está representada por la SEQ ID NO: 20, y la secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEQ ID NO: 21.

134-2 : Secuenciación de nucleótidos de la región variable que codifica el ADNc del anticuerpo C7 La secuenciación de nucleótidos se realizó de la misma manera en el Ejemplo 134-1.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena liviana del anticuerpo C7 está representada por la SEQ ID NO: 22, y la secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEQ ID NO: 23.

La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo C7 está representada por la SEQ ID NO: 24, y la secuencia de aminoácidos correspondiente está representada por la SEQ ID NO: 25.

[0898]

Ejemplo 135: Producción del anticuerpo quimérico anti-CLDN6 chB1

135-1 : Construcción del vector de expresión para el anticuerpo quimérico anti-CLDN6 chB1 135-1-1: La construcción del vector de expresión pCMA-LK para cadenas livianas quiméricas y humanizadas

Aproximadamente 5,4 kb de un fragmento obtenido al digerir el plásmido pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen) con las enzimas de restricción XbaI y PmeI se enlazó a un fragmento de ADN que incluía una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de la cadena liviana humana y la región constante de la cadena κhumana, según lo representado por la SEQ ID NO: 26, mediante el uso de un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech) para preparar pcDNA3.3/LK. Se removió una unidad de expresión de neomicina del pcDNA3.3/LK para construir pCMA-LK.

135-1-2 : Construcción del vector de expresión pCMA-G1LALA para cadenas pesadas de tipo IgG1LALA quiméricas y humanizadas

Un fragmento de ADN obtenido al digerir el pCMA-LK con XbaI y PmeI para remover la secuencia señal de la cadena liviana y la región constante de la cadena κhumana se enlazó a un fragmento de ADN que incluye una secuencia de ADN que codifica la secuencia de señal de la cadena pesada humana y la región constante de IgG1LALA humana, según lo representado por la SEQ ID NO: 27, mediante el uso de un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech) para construir pCMA-G1LALA.

135-1-3 : Construcción del vector quimérico de expresión de cadena pesada chB1

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 36 a 440 de la secuencia de nucleótidos para la cadena pesada de chB1, según lo representado por la SEQ ID NO: 33, fue sintetizado (GeneArt). El pCMA-G1LALA se escindió con la enzima de restricción BlpI, y el fragmento de ADN sintetizado se insertó en la porción escindida usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech) para construir un

vector de expresión de cadena pesada chB1. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de chB1 está representada por la SEQ ID NO: 32.

135-1-4 : Construcción del vector quimérico de expresión de cadena liviana chB1

Un fragmento de ADN que incluía una secuencia de ADN que codifica la cadena liviana de chB1, según lo representado por la SEQ ID NO: 29, fue sintetizado (GeneArt). Al usar un kit de clonación de In-Fusion HD PCR (Clontech), el fragmento de ADN sintetizado se enlazó a un fragmento de ADN obtenido al digerir el pCMA-LK con XbaI y PmeI para remover la secuencia señal de la cadena liviana y la región constante de la cadena κ humana para construir un vector de expresión de cadena liviana chB1. La secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de chB1 está representada por la SEQ ID NO: 28.

135-2 : Producción y purificación del anticuerpo quimérico anti-CLDN6

chB1 135-2-1: Producción de anticuerpo quimérico chB1

Las células FreeStyle 293F (Invitrogen) se pasaron y se cultivaron de acuerdo con el manual de instrucciones. En un matraz Erlenmeyer de 3 L de Fernbach (Corning Incorporated), se sembraron $1,2 \times 10^9$ células FreeStyle 293F (Invitrogen) en la fase de crecimiento logarítmico, y se diluyeron con el medio de expresión FreeStyle293 (Invitrogen) para ajustar a $2,0 \times 10^6$ células/mL. A 40 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen), se añadieron 0,24 mg del vector de expresión de la cadena pesada, 0,36 mg del vector de expresión de la cadena liviana y 1,8 mg de polietilenimina (Polyscience, Inc., # 24765), y se agitó cuidadosamente, y luego se dejó en reposo durante 5 minutos, y luego se agregó a las células FreeStyle 293F. Después de agitar el cultivo a 90 rpm en una incubadora a 37 °C y 8 % de $CO_2$ durante 4 horas, 600 ml de medio EX-CELL VPRO (SAFC Biosciences, Inc.),se añadieron 18 mL de GlutaMAX I (Gibco) y 30 mL de ultrafiltrado de yeastolato (Gibco), y el resultante se sometió a cultivo por agitación a 90 rpm en una incubadora a 37 °C y 8 % de $CO_2$ durante 7 días, y el sobrenadante de cultivo resultante se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (ADVANTEC, # CCS-045- E1H). El anticuerpo quimérico anti-CLDN6 obtenido se designó como "chB1".

135-2-2: Purificación del anticuerpo quimérico chB1

El anticuerpo se purificó del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 135-2-1

a través de cromatografía de afinidad con rProteína A en un paso. El sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna empaquetada con MabSelectSuRe (producido por GE Healthcare Bioscience) equilibrado con PBS, y luego la columna se lavó con PBS en una cantidad dos veces o más del volumen de columna.135-2 -2: Posteriormente, la elución se realizó con una solución 2 M de hidrocloruro de arginina (pH de 4,0), y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. El anticuerpo se sometió a desplazamiento de tampón para el PBS (-) por diálisis (Thermo Scientific, Casete de diálisis Slide-A-Lyzer). Por último, la fracción se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo UF VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius AG) para ajustar la concentración de IgG a 1 mg/mL o más. Finalmente, la fracción se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius AG), y el resultante se usó como una muestra purificada. [0899]

Ejemplo 136: Producción del anticuerpo anti-CLDN6 humanizado 136-1: Diseño de la forma humanizada del anticuerpo anti-CLDN6

136-1-1 : Modelado molecular de la región variable del anticuerpo quimérico chB1

Se usó un método conocido como modelado por homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)) para el modelado molecular de la región variable de chB1. El modelado molecular se llevó a cabo utilizando el programa de análisis conformacional de proteínas BioLuminate (Schrodinger, Inc.) disponible en el mercado con una estructura (PDB ID: 1XIW), como modelo, registrada en banco de datos de proteínas (Protein Data Bank) (Nucleic Acids Research 35, D301-D303 (2007)) con alta identidad de secuencia a las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana de chB1.

136-1-2 : Diseño de secuencia de aminoácidos humanizados

El chB1 fue humanizado por injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86, 10029- 10033 (1989)). La secuencia de consenso del subgrupo 1 de la cadena gamma humana y aquella del grupo 1 de la cadena kappa especificada en Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición, Public Health Service

National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) tenía una alta identidad con las regiones marco del chB1 y, por lo tanto, se seleccionaron respectivamente como aceptores para la cadena pesada y para la cadena liviana. Los residuos de los donantes a transferir a los receptores se seleccionaron a través del análisis de modelo tridimensional, por ejemplo, con referencia a los criterios proporcionados por Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86, 10029-10033 (1989)). Debido a que el CDRL3 era rico en aminoácidos hidrófobos, se diseñó adicionalmente una cadena liviana humanizada con mutación en el CDRL3.

136-2 : Humanización de la cadena pesada de chB1

Las tres cadenas pesadas diseñadas fueron designadas como hH1, hH2 y hH3. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH1 está representada por la SEQ ID NO: 52 (Figura 34). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 52, está representada por la SEC ID NO: 53 (Figura 34). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH2 está representada por la SEQ ID NO: 56 (Figura 36). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 56, está representada por la SEC ID NO: 57 (Figura 36). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH3 está representada por la SEQ ID NO: 60 (Figura 38). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 60, está representada por la SEC ID NO: 61 (Figura 38).

La Figura 45 muestra la comparación entre las secuencias de aminoácidos de chB1_H, que es la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano anti-CLDN6 chB1 demostrado en el Ejemplo 135, y las cadenas pesadas del anticuerpo humanizado hH1, hH2 y hH3. Cada "·" en las secuencias de hH1, hH2 y hH3 denota un residuo de aminoácido idéntico al de chB1_H en la posición, y cada posición con un símbolo de

letra de un residuo de aminoácido indica que el residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido sustituido.

136-3 : Humanización de la cadena liviana de chB1

Las cuatro cadenas livianas designadas se designaron como hL1, hL2, hL3, y hL4.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena liviana de hL1 está representada por la SEQ ID NO: 36 (Figura 26). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 36, está representada por la SEC ID NO: 37 (Figura 26). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena liviana de hL2 está representada por la SEQ ID NO: 40 (Figura 28). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 40 está representada por la SEQ ID NO: 41 (Figura 28). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena liviana de hL3 está representada por la SEQ ID NO: 44 (Figura 30). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 44, está representada por la SEC ID NO: 45 (Figura 30). La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena liviana de hL4 está representada por la SEQ ID NO: 48 (Figura 32). La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 48, está representada por la SEC ID NO: 49 (Figura 32). La Figura 46 muestra la comparación entre las secuencias de aminoácidos de chB1_L, que es la cadena liviana del anticuerpo quimérico humano anti-CLDN6 chB1 demostrado en el Ejemplo 135, y las cadenas livianas del anticuerpo humanizado, hL1, hL2, hL3 hL4. Cada "·" en las secuencias de hL1, hL2, hL3, and hL4 denota un residuo de aminoácido idéntico al de chB1_L en la posición, y cada posición con un símbolo de letra de un residuo de aminoácido indica que el residuo de aminoácido es un residuo de aminoácido sustituido.

136-4 : Diseño del anticuerpo humanizado con combinación de la cadena pesada con la cadena liviana

Un anticuerpo que consiste en hH1 y hL1 se denomina “anticuerpo H1L1” o “H1L1”. Un anticuerpo que consiste en hH2 y hL2 se denomina "anticuerpo H2L2" o "H2L2". Un anticuerpo que consiste en hH1 y hL3 se denomina "anticuerpo H1L3" o "H1L3". Un anticuerpo que consiste en hH2 y hL4 se denomina "anticuerpo H2L4" o "H2L4". Un anticuerpo que consiste en hH3 y hL3 se denomina "anticuerpo H3L3 " o "H3L3 ".

136-5 : Producción del anticuerpo anti-CLDN6 humanizado

136-5-1 : Construcción del vector de expresión de cadena pesada

136-5-1-1: Construcción del vector de expresión de hH1

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 36 a 440 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 53 para hH1 se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de hH1 de la misma manera que en el Ejemplo 135-1-3.

136-5-1-2 : Construcción del vector de expresión de hH2

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 36 a 440 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 57 para hH2 se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de hH2 de la misma manera que en el Ejemplo 135-1-3.

136-5-1-3 : Construcción del vector de expresión de hH3

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 36 a 440 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 61 para hH2 se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de hH3 de la misma manera que en el Ejemplo 135-1-3.

136-5-2 : Construcción del vector de expresión de cadena liviana

136-5-2-1: Construcción del vector de expresión de hL1

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 37 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 37 para hL1 se sintetizó (GeneArt). El pCMA- LK se escindió con la enzima de restricción BsiWI, y el fragmento de ADN sintetizado se insertó en la porción escindida usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech) para construir un vector de expresión hL1.

136-5-2-2 : Construcción del vector de expresión de hL2

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 37 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 41 para hL2 se sintetizó (GeneArt).

Se construyó un vector de expresión de hL2 de la misma manera que en el Ejemplo 136-5-2-1.

136-5-2-3 : Construcción del vector de expresión de hL3

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 37 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 45 para hL3 se sintetizó (GeneArt). Se

construyó un vector de expresión de hL3 de la misma manera que en el Ejemplo 136-5-2-1.

136-5-2-4 : Construcción del vector de expresión de hL4

El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 37 a 402 de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 49 para hL4 se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de hL4 de la misma manera que en el Ejemplo 136-5-2-1.

136-5-3 : Preparación de anticuerpos humanizados

136-5-3-1 : Producción de anticuerpos humanizados H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3

se produjeron de la misma manera que en el Ejemplo 135-2-1. H1L1, H2L2,

H1L3, H2L4 y H3L3 se produjeron usando las combinaciones de un vector de expresión de cadena pesada y un vector de expresión de cadena liviana correspondiente a las combinaciones de una cadena pesada y una cadena liviana mostradas en el Ejemplo 136-4.

136-5-3-2: - de anticuerpos humanizados H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 y H3L3

El sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 136-5-3-1 se purificó en dos etapas a través de cromatografía de afinidad con rProteína A e hidroxiapatita cerámica. El sobrenadante de cultivo se aplicó a una columna empaquetada con MabSelectSuRe (producido por GE Healthcare Bioscience) equilibrado con PBS, y la columna se lavó con PBS en una cantidad dos veces o más del volumen de columna. Posteriormente, el anticuerpo se eluyó con una solución 2 M de hidrocloruro de arginina (pH de 4.0). Una fracción que contenía el anticuerpo se sometió a desplazamiento de tampón para PBS mediante diálisis (Thermo Scientific, casete de diálisis Slide-A-Lyzer), se diluyó 5 veces con un tampón de fosfato de sodio 5 mM/MES 50 mM/pH de 7,0, y luego se aplicó a una columna de hidroxiapatita de cerámica (Bio-Rad Laboratories Japan, Inc., Columna de hidroxiapatita CHT Type-1 Bio-Scale) equilibrada con un tampón de NaPi 5 mM/MES 50 mM/NaCl 30 mM/pH de 7.0. La elución en gradiente de concentración lineal se realizó con cloruro de sodio, y se recogió una fracción que contenía el anticuerpo. La fracción se sometió a desplazamiento de tampón para HBSor (histidina 25 mM / sorbitol al 5 %, pH de 6,0) mediante diálisis (Thermo Scientific, casete de diálisis Slide-A-Lyzer). El anticuerpo se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo UF VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius AG) para ajustar la concentración de IgG a 50 mg/mL. Finalmente, la fracción se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius AG), y el resultante se usó como una muestra purificada.

[0900]

Ejemplo 137: Evaluación de la capacidad de unión del anticuerpo anti-CLDN6 de ratón mediante citometría de flujo.

La actividad de unión del anticuerpo anti-CLDN6 humanizado producido en el Ejemplo

136 para CLDN6 humano y sus moléculas familiares, CLDN3, CLDN4 y CLDN9, se evaluó usando un método de citometría de flujo. Células 293T fueron transfectadas transitoriamente de la misma manera que en el Ejemplo 133-1. A las células a las que se había transferido un gen CLDN6 humano o CLDN9 humano, se añadió el anticuerpo anti-CLDN6 humanizado H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 o H3L3, o un anticuerpo de control IgG1 humano (Calbiochem) y se suspendió a una concentración final de 100 nM, 20 nM, 4 nM o 0,8 nM, y el resultante se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. A las células en las que se había transferido un gen CLDN3 humano o CLDN4 humano o un vector vacío, se añadió el anticuerpo anti-CLDN6 humanizado H1L1, H2L2, H1L3, H2L4 o H3L3 y se suspendió a una concentración final de 100 nM, y el resultante se dejó en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich Co. LLC) que contenía suero bovino fetal al 5 % (Hyclone) (en adelante denominado PBS que contiene FBS al 5 %) y luego se añadió Anti-IgG humana de cabra, fragmento $F(ab')_2$, Fluoresceína (FITC) AffiniPure (FITC AffiniPure $F(ab')_2$ Fragment Goat IgG antihumana (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)) diluida 150 veces con PBS que contenía FBS al 5 %, y las células se suspendieron y se dejaron reposar a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS que contenía FBS al 5 %, la detección se realizó usando un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter, Inc.). El análisis de los datos se realizó utilizando FlowJo (Tree Star, Inc.), y se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la FITC, que indica la cantidad del anticuerpo de unión. La figura 42 muestra los resultados. En cada gráfico de la Figura 42, la abscisa representa las concentraciones de anticuerpos y la ordenada representa la MFI. El anticuerpo anti-CLDN6 humanizado se unió al CLDN6 humano y al CLDN9 humano en un grado similar, y no se unieron al CLDN3 humano ni al CLDN4 humano.
El IgG1 de control humano no se unió a ninguna de las
células.

[0901]

Ejemplo 138: Producción de la variante trastuzumab

138-1 : Construcción del vector de expresión de cadena pesada para trastuzumab-LALA. El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 36 a 434 de la

secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO: 74 para la cadena pesada de trastuzumab-LALA se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de la misma manera que en el Ejemplo 135-1-3. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de trastuzumab-LALA está representada por la SEQ ID NO: 75.

138-2 : Construcción del vector de expresión de la cadena liviana para trastuzumab-LALA. El fragmento de ADN que consiste en los residuos de nucleótidos 37 a 402 de la

secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO: 72 para la cadena liviana de trastuzumab-LALA se sintetizó (GeneArt). Se construyó un vector de expresión de la misma manera que en el Ejemplo 136-5-2-1. La secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de trastuzumab-LALA está representada por la SEQ ID NO: 73.

138-3 : Producción de la variante trastuzumab

Se produjo una variante de trastuzumab de la misma manera que en el Ejemplo 135-2-1.

138-4: Purificación de la variante trastuzumab

Trastuzumab-LALA se purificó del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 138-3 de la misma manera que en el Ejemplo 135-2-2, excepto que el desplazamiento del tampón no se llevó a cabo al PBS (-) sino para a la solución tampón de fosfato 50 mM (pH de 6,0).

[0902]

Ejemplo 139: Remodelación de la cadena de azúcar (variante de trastuzumab-MSG1) [Paso 1: Variante trastuzumab (Fucα1,6)GlcNAc

La operación en el paso 1 del Ejemplo 58 se realizó con aproximadamente 22,3 mg/mL de solución variante de trastuzumab (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (2,7 ml) preparado en el Ejemplo 138 para proporcionar 6,1 mg/mL de una solución variante

de trastuzumab (Fucα1,6)GlcNAc (tampón fosfato 50 mM (pH 6,0 )) (6,1 ml).

[0903]

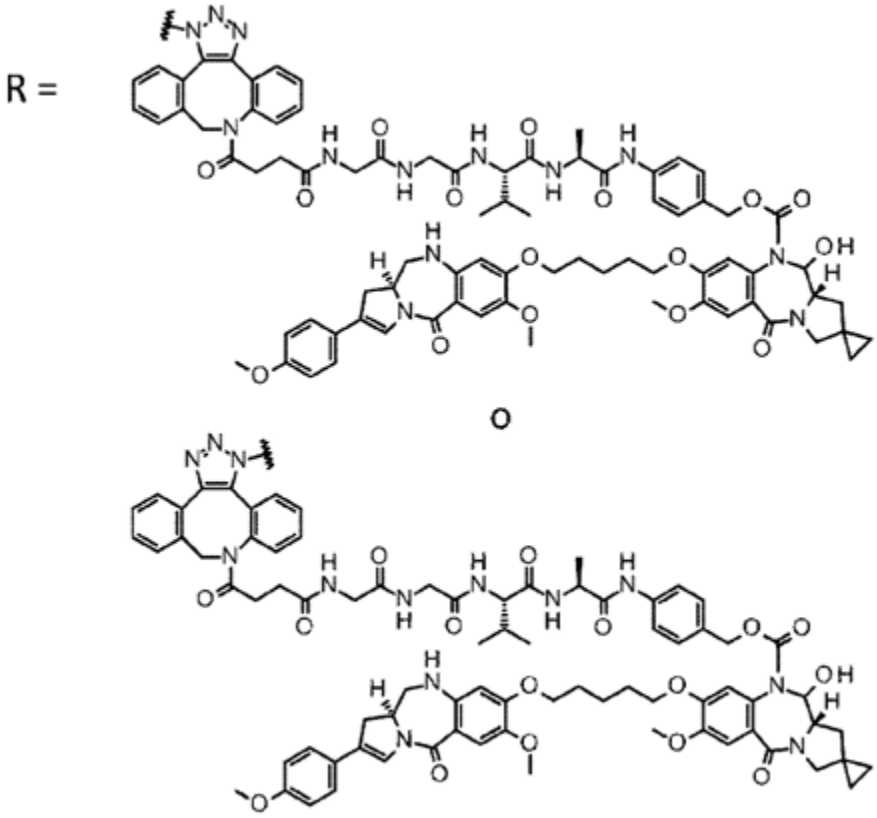
Paso 2: Variante trastuzumab-[MSG1-$N_3$]$_2$

La operación en el paso 1 en el Ejemplo 60 se realizó con la solución variante de trastuzumab (Fucα1,6)GlcNAc (tampón fosfato 50 mM (pH de 6,0)) (6,1 mL) obtenido en el paso 1 para proporcionar 10,2 mg/mL de solución variante de trastuzumab [MSG1-$N_3$]$_2$ (solución salina tamponada con fosfato (pH 6,0 )) (3,7 mL).

[0904]

Ejemplo 140: ADC55

[Fórmula 248]




(El compuesto que se obtiene en el paso 1 tiene isómeros geométricos del anillo de triazol como se ilustra en esta fórmula, y el compuesto obtenido en el paso 1 del Ejemplo 140 retiene un enlazador como una mezcla de las dos estructuras mostradas anteriormente como R.)

Paso 1: Conjugación del anticuerpo y el enlazador de fármacos

A una solución del anticuerpo obtenido en el paso 2 del Ejemplo 139 en solución salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) (10,2 mg/mL, 0,40 mL, se añadieron una solución

salina tamponada con fosfato (pH de 6,0) (0,40 mL), 1,2-propanodiol (0,767 ml), dimetilformamida (0,20 ml) y una solución de dimetilformamida 10 mM del compuesto obtenido en el paso 13 del Ejemplo 3 (0,033 mL; 12 equivalentes por molécula de anticuerpo) a temperatura ambiente, y el resultante se hizo reaccionar a temperatura ambiente con un rotador de tubos (MTR-103, AS ONE Corporation) durante 48 horas.
Operación de purificación: La solución se purificó utilizando la operación común D para proporcionar 7,00 mL de una solución que contenía el compuesto objetivo.
Caracterización: Los siguientes valores característicos se obtuvieron utilizando las operaciones comunes E y F.
Concentración de anticuerpos: 0,39 mg/mL, rendimiento de anticuerpos: 1,38 mg (35 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo (n): 1,8

[0905]

Ejemplo 141: Efecto anticelular del fármaco inmunoconjugado anti-HER2

Las células KPL-4 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School), una línea celular de células positivas para el antígeno HER2 de cáncer de mama humano, se prepararon con el medio RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific; en lo sucesivo, denominado medio RPMI) que contenía 10 % de suero bovino fetal (Hyclone) para alcanzar $6,25 \times 10^3$ células/mL, y se añadieron porciones de 80 µl de ellas a una microplaca de cultivo celular de 96 pocillos. Después de la adición de las células, las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante la noche.

Al día siguiente, porciones de 20 µL de un fármaco inmunoconjugado anti-HER2 diluidas con el medio RPMI a 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0,8 nM, 0,16 nM, 0,032 nM, 6,4 pM, 1,3 pM y 0,26 pM se añadieron a la microplaca. A cada pocillo sin ningún fármaco inmunoconjugado, se añadieron 20 µl de medio RPMI. Las células KPL-4 se cultivaron a 37 °C y 5 % de $CO_2$ durante 6 días. Después del cultivo, la microplaca se sacó de la incubadora y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió el Ensayo de Viabilidad de Células Luminiscentes CellTiter-Glo (Promega Corporation) en una cantidad equivalente a la de la solución de cultivo, y se agitó usando

un mezclador de placas. La microplaca se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, la cantidad de emisión se midió utilizando el lector de placas (PerkinElmer). Las tasas de supervivencia celular se calcularon de la misma manera que en el Ejemplo 123.

Cada uno de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 ADC49 y ADC55 exhibieron un efecto anticelular de $0,001 < IC_{50} < 0,01$ (nM) en las células KPL-4.

[0906]

Ejemplo 142: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 (1)

El efecto antitumoral de los fármacos inmunoconjugados anti-HER2 se midió utilizando los mismos animales experimentales y el método que en el Ejemplo 124.

Las células KPL-4 (Dr. Junichi Kurebayashi, Kawasaki Medical School) se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Sigma-Aldrich Co. LLC), y se trasplantaron $1.5 \times 10^7$ células subcutáneamente el flanco derecho de cada ratón hembra nude (Día 0), y los ratones se agruparon al azar el día 14. El conjugado de anticuerpo anti-HER2-fármaco ADC49 o el conjugado de anticuerpo anti-HER2-fármaco ADC55 fue administrado en la vena de la cola el día 14 a una dosis de 0,33 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 47 muestra los resultados. Los ADC49 y ADC55 exhibieron actividad antitumoral comparable con la administración de 0,33 mg/kg. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC49 o ADC55 en los ratones

[0907]

Ejemplo 143: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 (2)

Se suspendieron células JIMT-1 (DSMZ ACC 589) en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y se trasplantaron subcutáneamente $5 \times 10^6$

células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 11. El ADC55 se administró en la vena de la cola el día 14 en a una dosis de 0,4 mg/kg 0,2 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 48 muestra los resultados. Se encontró que el ADC55 tiene un fuerte efecto

antitumoral que causa la regresión del tumor en la administración de 0,4 mg/kg. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC55 para los ratones con ninguna dosis de administración.

[0908]

Ejemplo 144: Prueba antitumoral para el fármaco inmunoconjugado anti-HER2 (3)

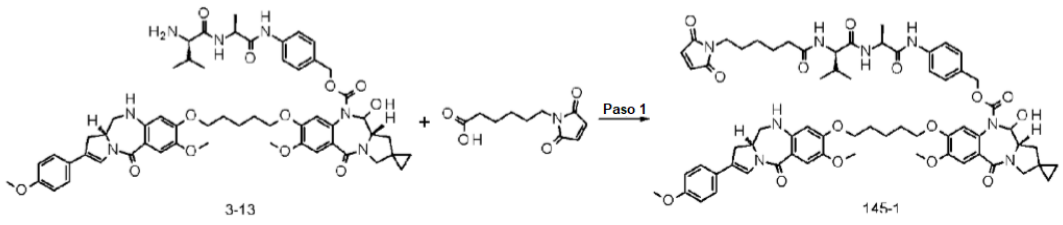
Se suspendieron células CFPAC-1 (ATCC CRL -1918) en solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y se trasplantaron subcutáneamente $5 \times 10^6$ células en el costado derecho de cada ratón *nude* hembra (Día 0), y los ratones fueron aleatoriamente agrupados el día 10. El fármaco inmunoconjugado anti-HER2 ADC49 o ADC55, o el fármaco inmunoconjugado anti-LPS ADC53 se administró en la vena de la cola el día 10 en una dosis de 0,4 mg/kg. Como grupo de control (grupo de vehículos), el tampón ABS se administró de la misma manera.

La figura 49 muestra los resultados. Se encontró un fuerte efecto antitumoral que causaba regresión del tumor en cualquier ratón al que se le había administrado ADC49 o ADC55. No se encontró pérdida de peso causada por la administración de ADC49, ADC55, o ADC53 en los ratones.

[0909]

Ejemplo 145: Enlazador de fármacos 43

[Fórmula 249]




A una solución del compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 3 (0,051 g, 0,049 mmol) y ácido maleimidocaproico disponible comercialmente (0,011 g, 0,054 mmol) en diclorometano (5 ml), se añadió 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (0,010 g, 0,054 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se diluyó la solución de reacción

con cloroformo, la capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio. Después de concentrar el solvente orgánico, el residuo resultante se purificó por cromatografía en de gel de sílice (cloroformo:metanol = 97,5:2,5 (v/v) a 90:10 (v/v)) para proporcionar el compuesto deseado (41 mg, 69 %).

$^1$H-RMN(DMSO-D$_6$)δ:9,94(1H,s),8,20-8,12(1H,m),7,86-7,77(1H,m),7,65-7,52(2H,m),7,45(1H,s),7,38(2H,d,J=7,9Hz),7,30(1H,s),7,24-7,16(2H,m),7,11-7,01(1H,m),7,00(2H,s),6,91(2H,d,J=8,5Hz),6,83-6,67(1H,m),6,63-6,45(2H,m),6,31(1H,s),5,81-5,71(1H,m),5,23-5,14(1H,m),4,86-4,74(1H,m),4,43-4,32(1H,m),4,24-4,11(2H,m),4,03-3,88(3H,m),3,88-3,69(4H,m),3,76(3H,s),3,66(3H,s),3,60-3,49(2H,m),3,47-3,08(5H,m),2,82-2,64(1H,m),2,40-2,29(1H,m),2,25-2,04(2H,m),2,04-1,89(1H,m),1,88-1,67(4H,m),1,63-1,38(7H,m),1,35-1,09(6H,m),0,90-0,76(6H,m),0,76-0,50(4H,m).

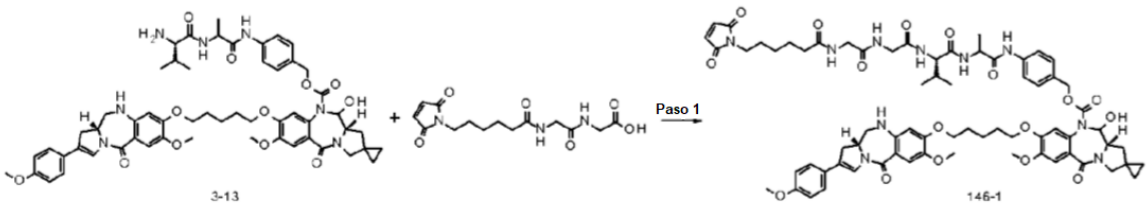
MS (APCI, ESI) m/z: 1224 $(M + H)^+$

Un anticuerpo anti-CLDN6 (Ejemplo 136(H1L1)-PBD ADC (conjugación de cisteína, $m^1 = 2$) del enlazador de fármacos 43 y enlazador de fármacos 44 (Ejemplo 146) fue producido utilizando un método conocido ((WO 2014/057687). El ADC exhibió un fuerte efecto antitumoral.

[0910]

Ejemplo 146: Enlazador de fármacos 44

[Fórmula 250]




El compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 3 (0,047 g, 0,046 mmol) y el N- [6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicina disponible en el mercado (0,016 g, 0,050 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el Ejemplo 145 para proporcionar el compuesto deseado (30 mg, 50 %).

$^1$H-RMN(DMSO-D$_6$)δ:9,92(1H,s),8,23(1H,d,J=6,7Hz),8,12-

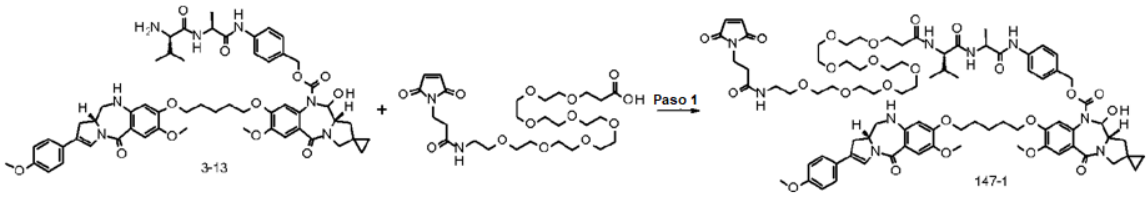
8,02(2H,m),7,84(1H,d,J=9,1Hz),7,65-7,50(2H,m),7,45(1H,s),7,38(2H,d,J=9,1Hz),7,30(1H,s),7,26-7,16(2H,m),7,10-7,02(1H,m),7,00(2H,s),6,91(2H,d,J=9,1Hz),6,82-6,67(1H,m),6,62-6,48(2H,m),6,31(1H,s),5,80-5,72(1H,m),5,25-5,15(1H,m),4,85-4,77(1H,m),4,43-4,30(1H,m),4,25-4,14(2H,m),4,06-3,87(3H,m),3,86-3,71(6H,m),3,76(3H,s),3,71-3,62(2H,m),3,66(3H,s),3,61-3,45(2H,m),3,45-3,08(1H,m),2,81-2,64(2H,m),2,39-2,29(1H,m),2,14-2,04(2H,m),2,05-1,90(1H,m),1,90-1,68(1H,m),1,62-1,39(7H,m),1,35-1,26(6H,m),1,26-1,13(6H,m),0,91-0,77(6H,m),0,75-0,52(4H,m).

MS (APCI, ESI) m/z: 1338 $(M + H)^+$

[0911]

Ejemplo 147: Enlazador de fármacos 45

[Fórmula 251]



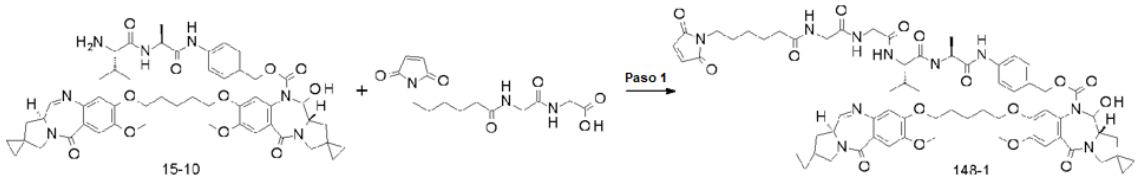

El compuesto obtenido en el paso 12 del Ejemplo 3 (0,050 g, 0,049 mmol) y el ácido 31-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) -29-oxo- 4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oico (0,029 g, 0,049 mmol) disponible en el mercado, se hicieron reaccionar de la misma manera que en el Ejemplo 145 para proporcionar el compuesto deseado (45 mg, 57 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1604 $(M + H)^+$

[0912]

Ejemplo 148: Enlazador de fármacos 46

[Fórmula 252]



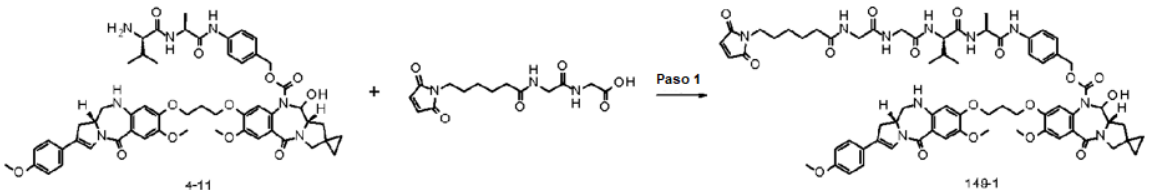

El compuesto obtenido en el paso 9 del Ejemplo 15 (0,081 g, 0,085 mmol) y el N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicina disponible en el mercado (0,042 g, 0,13 mmol) se hicieron reaccionar de la misma manera que en el paso 1 del Ejemplo 16 para proporcionar el compuesto deseado (0,089 g, 82 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1257 $(M + H)^+$

[0913]

Ejemplo 149: Enlazador de fármacos 47

[Fórmula 253]




A una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicina disponible en el mercado (0,036 g, 0,11 mmol) en diclorometano (10 ml), se añadió N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (0,035 g, 0,14 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la solución de reacción, se añadieron el compuesto obtenido en el paso 11 del Ejemplo 4 (0,10 g, 0,10 mmol) y metanol (1 ml), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de concentrar la solución de reacción,

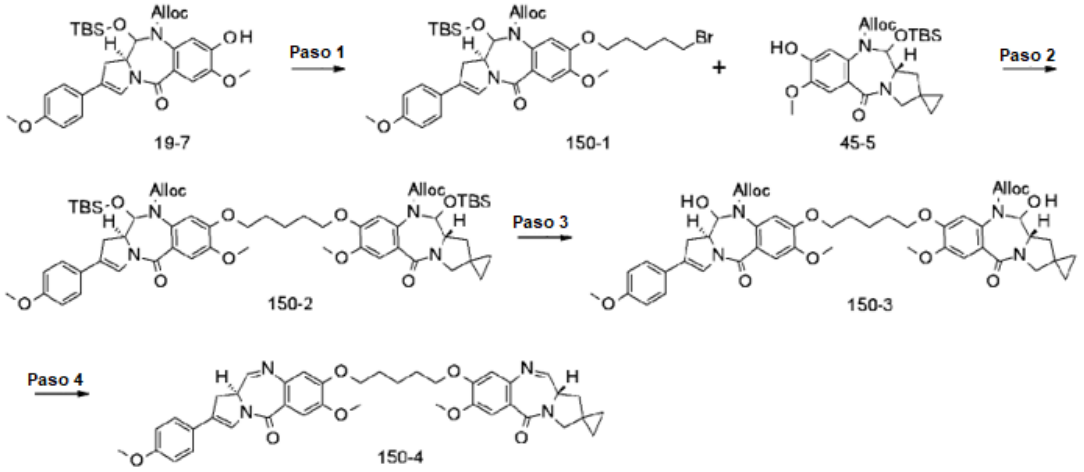
el residuo resultante se purificó por cromatografía en gel de sílice (cloroformo - cloroformo:metanol = 80:20 (v/v)) para proporcionar el compuesto deseado (0,078 g, 60 %).

MS (APCI, ESI) m/z: 1309 $(M + H)^+$

[0914]

Ejemplo 150: Fármaco 11

[Fórmula 254]




[Pasos 1 al 4]

El compuesto obtenido en el paso 7 del Ejemplo 19 se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 3, paso 10 del Ejemplo 3, paso 11 del Ejemplo 3 y que en el paso 10 del

Ejemplo 3 para proporcionar el fármaco 11.

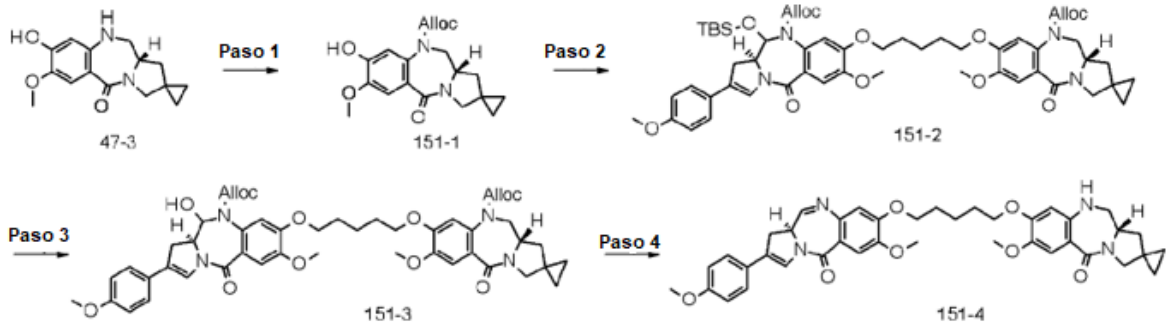
$^1$H-RMN($CDCl_3$)δ:7,89-7,80(1H,m),7,60-7,51(2H,m),7,43-7,40(1H,m),7,34-7,30(2H,m),6,91-6,88(2H,m),6,81(1H,d,J=3,0Hz),4,39-4,32(1H,m),4,11-4,06(4H,m),3,95(4H,d,J=3,0Hz),3,87-3,84(5H,m),3,68-3,61(2H,m),3,51-3,49(3H,m),3,44-3,34(2H,m),2,53(1H,dd,J=13,0, 8,2Hz),2,01-1,96(4H,m),1,69-1,68(2H,m),1,30-1,25(1H,m),0,93-0,77(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 691 $(M + H)^+$

[0915]

Ejemplo 151: Fármaco 12

[Fórmula 255]




[Paso 1]

El compuesto obtenido en el paso 3 del Ejemplo 47 (0,77 g, 2,8 mmol) se disolvió en diclorometano (20 ml), y se añadieron piridina (0,338 ml, 4,20 mmol) y cloroformiato de alilo (0,355 ml, 3,36 mmol) a 0 °C, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que la solución de reacción se concentró, el residuo resultante se disolvió en metanol (20 ml), y se le añadió carbonato de potasio (1,93 g, 14,0 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó de forma continua durante 3 horas. Se añadió agua a la solución de reacción, y el metanol se removió por destilación a presión reducida, y se añadió ácido clorhídrico 1 N al residuo resultante, el cual se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se filtró, y el disolvente se removió por destilación a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice [hexano:acetato de etilo = 100:0 (v/v) a 0:100 (v/v)] para proporcionar el compuesto deseado (0,921 g, 92 %) cómo un sólido amarillo pálido.

MS(APCI, ESI) m/z: 359 $(M + H)^+$

[Pasos 2 al 4]

El compuesto obtenido en el paso 1 se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 10 al 12 del Ejemplo 3 para proporcionar el fármaco 12.

$^1$HRMN($CDCl_3$)δ:7,89(1H,d,J=4,2Hz),7,59(1H,s),7,53(1H,s),7,40(1H,s),7,34(2H,d,J=8.5Hz),6,91(2H,d,J=8,5Hz),6,82(1H,s),6,05(1H,s),4,44-4,39(1H,m),4,16-4,11(2H,m),4,09-4,04(2H,m),3,99(2H,t,J=6,7Hz),3,95(3H,s),3,84(6H,s),3,72(1H,d,J=12,1Hz),3,59-

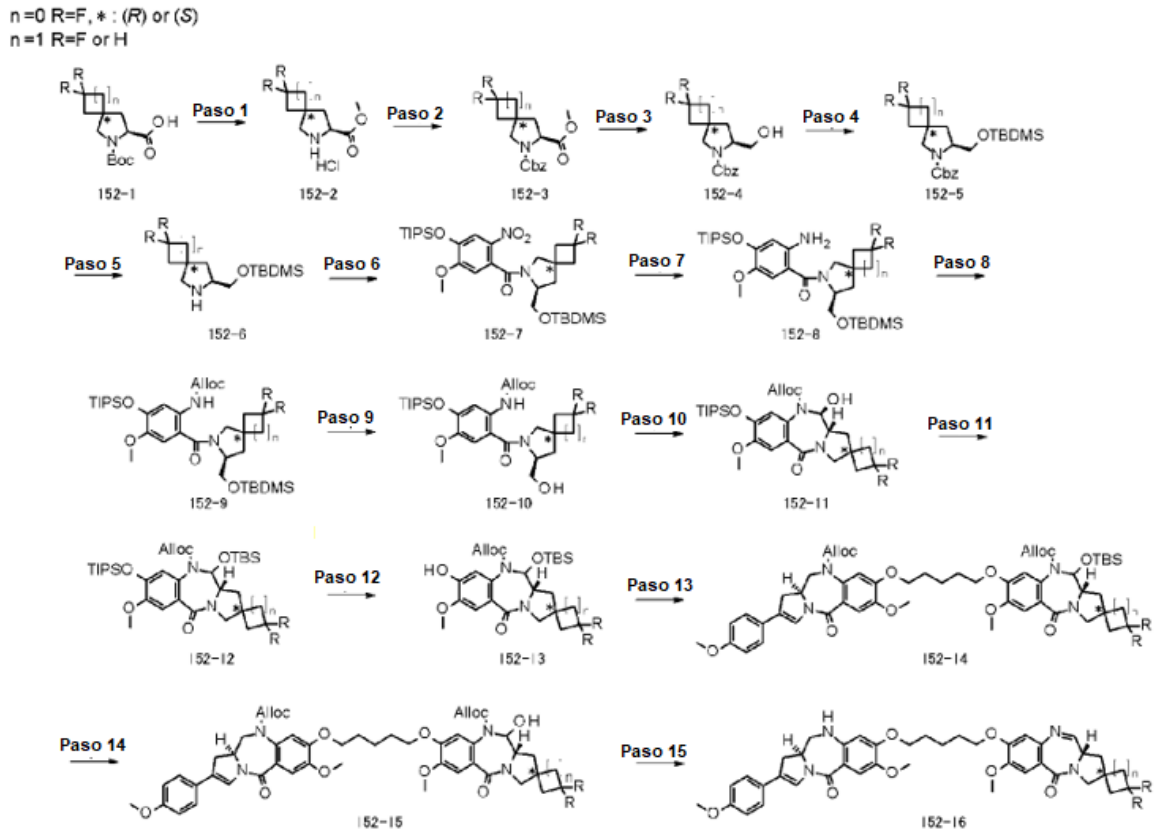
3,49(3H,m),3,45-3,34(2H,m),2,00-1,92(4H,m),1,79(1H,dd,J=12,4, 7,0Hz),1,70-1,64(2H,m),1,25(1H,t,J=7,0Hz),0,73-0,55(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 693 $(M + H)^+$

[0916]

Ejemplo 152: Fármacos 13 a 16

[Fórmula 256]




[Derivado de ciclobutilo: fármaco 13] n = 1, R = F [Pasos 1]

A una solución de NT-BOC-4-(3,3-difluorociclobutil)-L-prolina disponible en el mercado (OmegaChem Inc., OC-0707) (12 g, 41 mmol) en metanol (200 ml), se añadieron cloruro de tionilo (10 mL, 138 mmol) lentamente gota a gota a -78 °C (baño de hielo seco-acetona). Después de la adición gota a gota, se retiró el baño de refrigerante, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el residuo se lavó luego con éter etílico para proporcionar el compuesto deseado (10 g, cuant.)

[Paso 2]

A una solución en suspensión del compuesto obtenido en el paso 1 (10 g, 41,4 mmol) y carbonato de sodio (8,77 g, 82,7 mmol) en 1,4-dioxano (200 mL y agua (50 mL), se añadió cloroformiato de bencilo (8,82 ml , 62,0 mmol) lentamente enfriando con hielo. Una vez completada la reacción, se añadió agua a la misma y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera,

y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, el solvente se removió por destilación a presión reducida para proporcionar el compuesto deseado.

[Pasos 3 al 15]

El compuesto obtenido en el paso previo se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 1 al 5 del Ejemplo 45 para proporcionar el fármaco 13.

$^1$HRMN($CDCl_3$)δ:7,72-7,71(1H,m),7,53-7,49(3H,m),7,34-7,28(2H,m),6,91-6,78(3H,m),6,06-6,03(1H,m),4,35-4,28(1H,m),4,16-4,04(2H,m),4,02-3,96(1H,m),3,94(3H,s),3,90-3,76(2H,m),3,84(2H,s),3,82(3H,s),3,59-3,31(2H,m),2,76-2,44(8H,m),1,99-1,88(4H,m),1,71-1,59(4H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 743 $(M + H)^+$

[0917]

[Derivado de ciclobutilo: fármaco 14] n = 1, R

= H [Pasos 2 a 15]

El clorhidrato de éster metílico de 4-ciclobutil-L-prolina disponible en el mercado (OmegaChem Inc., OC-0728) se hizo reaccionar de la misma manera que en el paso 2, los pasos 1 a 5 del Ejemplo 1, y los pasos 1 a 8 del Ejemplo 45 para proporcionar enlazador de drogas 14.

$^1$HRMN($CDCl_3$)δ:7,73-7,45(3H,m),7,34-7,14(2H,m),6,94-6,42(3H,m),6,05-5,99(1H,m),5,30-5,06(2H,m),4,49-4,28(2H,m),4,17-3,96(2H,m),3,95-3,79(9H,m),3,77-

3,30(6H,m),2,77-2,70(1H,m),2,37-2,30(1H,m),2,19-1,85(8H,m),1,73-1,55(5H,m),1,30-1,16(2H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 707 $(M + H)^+$

[Derivado de ciclopropilo: fármaco 15] n = 0, R = F,*: (S) N-t-BOC-4S-(2,2-difluorociclopropil)-L-prolina disponible en el mercado (OmegaChem Inc., OC-0732) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 1 a 15 para proporcionar el enlazador de fármacos 15.

$^1$HRMN($CDCl_3$)δ:7,76-7,75(1H,m),7,54-7,47(3H,m),7,33-7,27(2H,m),6,93-6,85(2H,m),6,83-6,79(1H,m),6,08-5,96(1H,m),4,32-4,30(1H,m),4,16-3,96(3H,m),3,94(3H,s),3,84(3H,s),3,82(3H,s),3,74-3,67(3H,m),3,59-3,51(2H,m),3,39-3,34(1H,m),2,76-2,69(2H,m),2,38-2,33(1H,m),1,98-1,89(4H,m),1,69-1,54(4H,m),1.30-1,22(2H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 729 $(M + H)^+$

[0918]

[Derivado de ciclopropilo: fármaco 16] n = 0, R = F,*: (R) N-t-BOC-4S-(2,2-difluorociclopropil)-L-prolina disponible en el mercado (OmegaChem Inc., OC-0722) se hizo reaccionar de la misma manera que en los pasos 1 a 15 para proporcionar el enlazador de fármacos 16.

$^1$HRMN($CDCl_3$)δ:7,76-7,69(1H,m),7,55-7,44(3H,m),7,33-7,28(2H,m),6,94-6,80(2H,m),6,59-6,42(1H,m),6,08-5,97(1H,m),4,36-4,24(1H,m),4,20-3,95(3H,m),3,95-3,76(12H,m),3,75-3,50(2H,m),3,42-3,31(1H,m),2,79-2,52(2H,m),2,48-2,32(1H,m),2,06-1,83(4H,m),1,72-1,41(4H,m),1,28-1,15(2H,m).

MS(APCI, ESI) m/z: 729 $(M + H)^+$

[0919]

Ejemplo 153: $[N_3\text{-PEG (3)}]_2$-SG (10)

Paso 1: Fmoc-(SG-) Asn, forma libre.

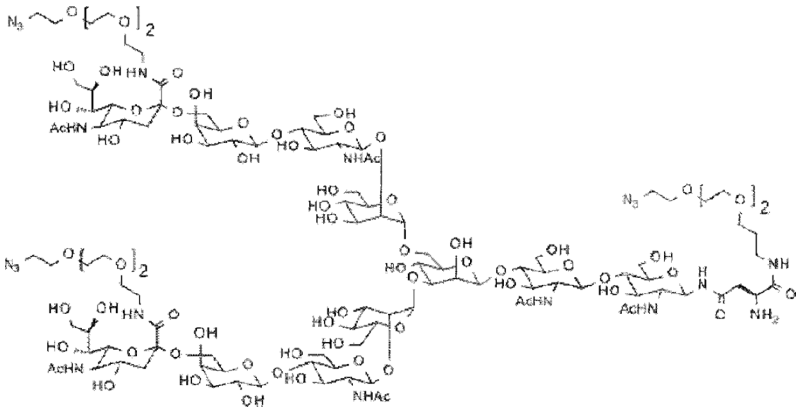
Fmoc- (SG-) Asn (1S2S-11NC-Asn-Fmoc, producido por GlyTech, Inc., 2 g) se disolvió en una cantidad apropiada de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 %, y se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa en

múltiples operaciones separadas. El eluyente era una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo al 0,1 % de ácido trifluoroacético, el aparato utilizado era un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.) y la columna utilizada era una ODS de Inertsil 3 (producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el producto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron. Se obtuvo un sólido incoloro (1,8 g).

[0920]

Paso 2: Síntesis de ([$N_3$-PEG (3)]$_2$-SG)-Asn-PEG (3)-$N_3$

[Fórmula 257]



A una solución de N,N-dimetilformamida (10 ml) de la forma libre de Fmoc-(SG-) Asn preparada en el paso 1 (1000 mg), se añadieron una solución de N,N-dimetilformamida (3 ml) de HATU (891 mg, 2,34 mmol) y una solución de N,N-dimetilformamida (3 ml) de 11-azida-3,6,9-trioxaundecano-1-amina (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 511 mg, 2,34 mmol) y diisopropiletilamina (816 μL, 4,69 mmol), y el resultante se agitó a 37 °C durante 3 horas. Además, se le añadió una solución de N,N-dimetilformamida (500 μ l) de HATU (148 mg, 0,39 mmol), y el resultante se agitó a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, se añadió piperidina (386 μl, 3,91 mmol) a la misma, y el resultante se agitó a 37 °C durante 1 hora. Una vez completada la reacción, se añadió ácido acético (469 μl) a la misma.

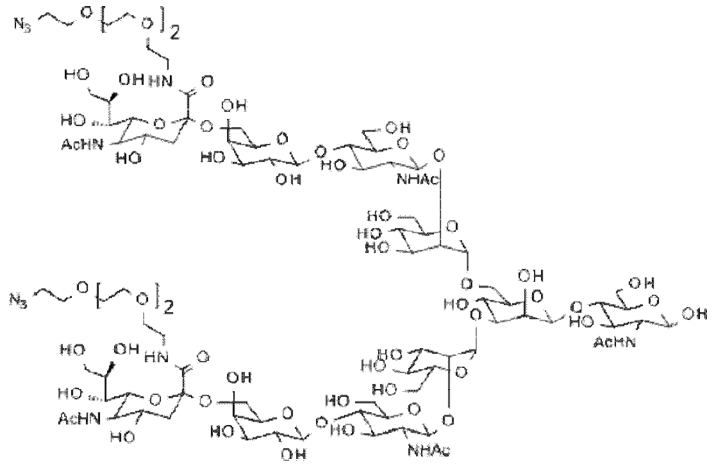
La solución de reacción se redujo a la mitad y se transfirió a dos tubos cónicos jumbo

(175 ml) a cada uno de los cuales se había añadido previamente éter etílico (100 ml). La materia sólida se precipitó utilizando una centrífuga pequeña (Hitachi Koki Co., Ltd., CF16RX) y se eliminó el sobrenadante. La materia sólida similar a la goma se transfirió a un tubo de centrífuga (50 mL, y se añadieron al mismo éter dietílico (30 ml) y acetonitrilo (10 ml), y el resultante se decantó. Esta operación se repitió dos veces. De la misma manera, se añadió una cantidad apropiada de acetonitrilo o una cantidad apropiada de éter etílico y el resultante se decantó, y luego se secó a presión reducida para proporcionar un producto crudo. La materia sólida obtenida se disolvió en una cantidad apropiada de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,2 % y se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente fue un 0.1 % de solución acuosa de ácido trifluoroacético y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 (producida por GL Sciences, Inc .). Las fracciones que contenían el producto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado del título (637 mg) como un sólido incoloro.

ESI-MS: Calculado para $C_{112}H_{192}N_{20}O_{70}$: $[M+3H]^{3+}$ 980,6(ave.), Encontrado 980,4

[0921]

Paso 3: Síntesis de ($[N_3$-PEG (3)$]_2$-SG)-Asn-PEG (3)-N3 [Fórmula 258]



In un tubo de 2 mL, se disolvió el ($[N_3$-PEG (3)$]_2$-SG)-Asn-PEG (3)-$N_3$ sintetizado en el

paso 2 (78,6) en tampón de fosfato 100 mM (NACALAI TESQUE, INC., 465 μL) con pH de 6,0. A esto, se añadió 1 U/mL de EndoM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., 70 μL), y el resultante se agitó a 28 °C durante 5 horas, y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 4 días. Después de terminar la reacción, se le añadió una cantidad apropiada de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,2 % y se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 ( producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el producto deseado detectado por UV (220 nm) durante la elución se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado del título (40 mg) como un sólido incoloro.

ESI-MS: Calculado para $C_{92}H_{157}N_{13}O_{61}$: $[M+2H]^{2+}$ 1211,7(ave.), Encontrado 1211,5

[0922]

Ejemplo 154: [$N_3$-PEG (3)]-MSG2 (9), [$N_3$-PEG (3)]-MSG1 (9)

Paso 1: (MSG1-)Asn y (MSG2-)Asn

El producto disponible en el mercado libre de monosialo-Asn (1S2G/1G2S-10NC-Asn, producido por GlyTech, Inc.) (denominado "(MSG-) Asn") (500 mg) se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa en las condiciones siguientes para separar en (MSG1-)Asn eluido como el primer pico principal (tiempo de retención: alrededor de 15 a 19 min) y (MSG2-)Asn eluido como el segundo pico principal (tiempo de retención: alrededor de 21 a 26 min). El eluyente utilizado fue una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1 %, el aparato utilizado fue un sistema preparativo de activación ELS-PDA (producido por JASCO Corporation), la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 (10 um, 30 ϕ ×250 mm, producido por GL Sciences, Inc.), y la tasa de flujo fue de 30 mL/min. Las fracciones pertenecientes al primer pico detectado por UV (210 nm) durante la elución se recogieron, y se liofilizaron para

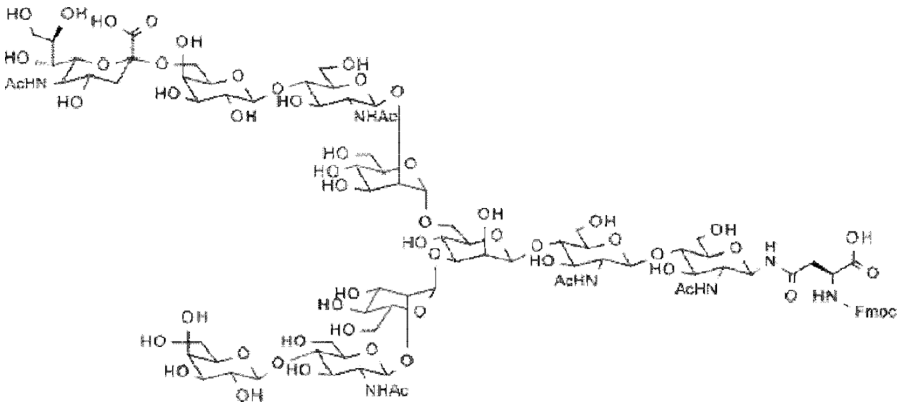
proporcionar el (MSG1- )Asn (238 mg) como un sólido incoloro. Las fracciones

pertenecientes al segundo pico detectado por UV se recogieron y se liofilizaron para proporcionar (MSG2-)Asn (193 mg) como un sólido incoloro.

[0923]

Paso -2: Forma libre de Fmoc-(MSG2-

) Asn [Fórmula 259]




El (MSG2-)Asn sintetizado en el paso 1 (900 mg) se disolvió en una solución de N,N-dimetilformamida (6 mL)/agua destilada (2 ml) y se le añadieron diisopropiletilamina (0,23 mL) y carbonato de 9-fluorenilmetil N-succinimidil (223 mg), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadieron a la misma diisopropiletilamina (0,16 ml), carbonato de 9-fluorenilmetil N-succinimidil (74 mg) y solución de N,N-dimetilformamida (1 mL), y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La solución de reacción se redujo a la mitad y se transfirió a dos tubos cónicos jumbo (175 ml) a cada uno de los cuales se había añadido previamente éter etílico (80 ml)/acetonitrilo (4 ml). La materia sólida se precipitó utilizando una centrífuga pequeña (Hitachi Koki Co., Ltd., CF16RX) y se eliminó el sobrenadante. La materia sólida similar a la goma se transfirió a un tubo de centrífuga (50 mL, y se añadieron al mismo éter dietílico (30 ml) y acetonitrilo (10 ml), y el resultante se decantó. Esta operación se repitió dos veces. De la misma manera, se añadió una cantidad apropiada de acetonitrilo o una cantidad apropiada de éter etílico y el resultante se decantó, y luego

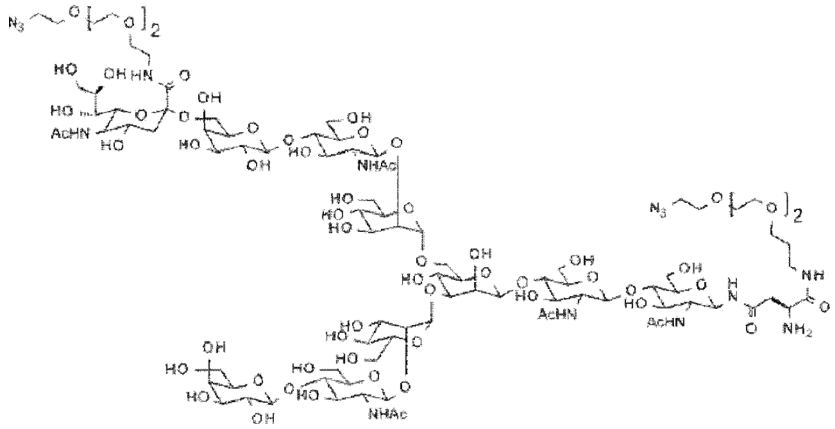
se secó a presión reducida para proporcionar un producto crudo. La materia sólida

obtenida se disolvió en una cantidad apropiada de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,2 % y se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente fue un 0.1 % de solución acuosa de ácido trifluoroacético y una solución de acetonitrilo de ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un Purif-Rp2 (producido por Shoko Scientific Co., Ltd.), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 (producida por GL Sciences, Inc .). Durante la elución, las fracciones que contenían el producto deseado detectado por UV (220 nm) se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado del título (830 mg) como un sólido incoloro.

[0924]

Paso 3: ([$N_3$-PEG (3)]-MSG2)-Asn-PEG (3)-$N_3$

[Fórmula 260]

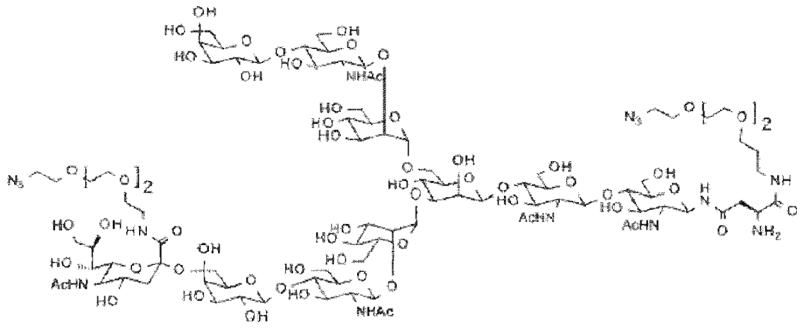


Con el uso de Fmoc-(MSG2-)Asn sintetizado en el paso 2 (830 mg, se obtuvo un producto bruto del producto deseado del título (1,06 g) de la misma manera que en el paso 2 del Ejemplo 153. Esto se usó para la reacción posterior sin purificación adicional.

[0925]

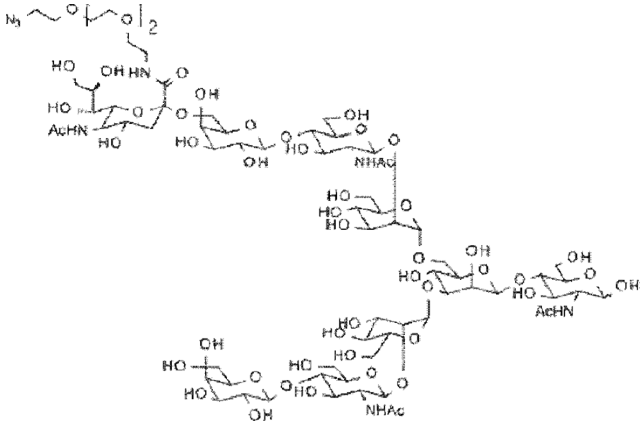
De manera similar, el siguiente ([$N_3$-PEG (3)]-MSG1)-Asn-PEG (3)-$N_3$ puede sintetizarse a partir de Fmoc-(MSG1-)Asn.

[Fórmula 261]



Paso 4: [$N_3$-PEG (3)]-MSG2 (9)

[Fórmula 262]



En un vial para recogida de 2 ml, el producto bruto de ([$N_3$-PEG (3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-$N_3$ sintetizado en el paso 3 (150 mg) se disolvió en tampón de fosfato de potasio 200 mM (750 μL) con pH de 6,25 preparado con $KH_2PO_4$ 200 mM y $KH_2PO_4$ 200 mM. Se le añadió Endo-Rp (3 ug), y el resultante se dejó en reposo a 50 °C durante 16 horas. Después de terminar la reacción, se añadió a la misma una solución acuosa al 5 % de ácido trifluoroacético (150 μl), y el resultante se sometió a separación/purificación por HPLC de fase inversa. El eluyente era una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1 % y una solución de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %, el aparato utilizado fue un sistema preparativo de activación ELS-PDA (producido por JASCO Corporation), y la columna utilizada fue una Inertsil ODS-3 ( producida por GL Sciences, Inc.). Las fracciones que contenían el producto deseado detectado por UV (210 nm) durante la elución se recogieron y se

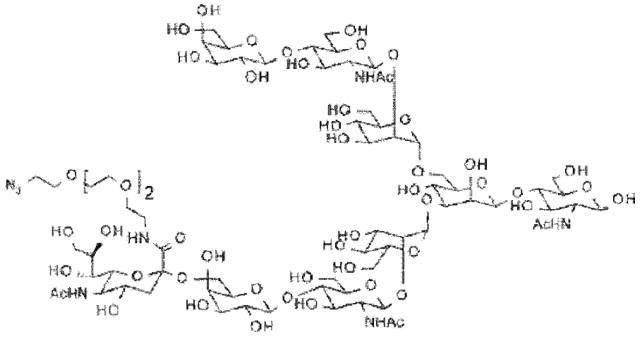
liofilizaron para proporcionar el compuesto deseado del título (62 mg) como un sólido incoloro.

ESI-MS: Calculado para $C_{73}H_{124}N_8O_{51}$: $[M+2H]^{2+}$ 965,3(ave.), Encontrado 965,4

[0926]

De forma similar, el siguiente [$N_3$-PEG(3)]-MSG1 (9) puede sintetizarse a partir de ([$N_3$-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-$N_3$.

[Fórmula 263]



Aplicación industrial

[0927]

El uso de un fármaco inmunoconjugado, anticuerpo o derivado de PBD, etcétera, de la presente invención, permite el tratamiento o la prevención de varios cánceres.

Texto libre del listado de secuencias [0928]

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de CLDN6 humano

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de CLDN6 humano

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos de CLDN9 humano

SEQ ID NO: 4 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifican la secuencia de aminoácidos de CLDN9 humano

SEQ ID NO: 5 - Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de la cadena liviana

del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 6 - Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de la cadena liviana del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 7 - Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de la cadena liviana del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 8 - Secuencia de aminoácidos de CDRL4 de la cadena liviana del anticuerpo B1 humanizado SEQ ID NO

SEQ ID NO: 9 - Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 10 - Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 11 - Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 12 - Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de la cadena liviana del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 13 - Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de la cadena liviana del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 14 - Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de la cadena liviana del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 15 - Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 16 - Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de la cadena pesada del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 17 - Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 18- La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifican la región variable de la cadena liviana del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 19 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana

del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 20- La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifican la región variable de la cadena pesada del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 21 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo B1

SEQ ID NO: 22- La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifican la región variable de la cadena liviana del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 23 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 24- La secuencia de nucleótidos de ADNc que codifican la región variable de la cadena pesada del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 25 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo C7

SEQ ID NO: 26 - Fragmento de ADN incluyendo la secuencia de ADN que codifican la secuencia señal de la cadena liviana humana y la región constante de la cadena κ humana

SEQ ID NO: 27 - Fragmento de ADN incluyendo la secuencia de ADN que codifican la secuencia señal de la cadena pesada humana y la región constante de la LALA IgG1 humano

SEQ ID NO: 28 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana chB1

SEQ ID NO: 29 - Fragmento de ADN que incluye la secuencia de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana chB1

SEQ ID NO: 30 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana chB1

SEQ ID NO: 31 - Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena liviana chB1

SEQ ID NO: 32 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada chB1

SEQ ID NO: 33 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena pesada chB1

SEQ ID NO: 34 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada chB1

SEQ ID NO: 35 - Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada chB1

SEQ ID NO: 36 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana hL1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 37 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena liviana hL1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 38 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana hL1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 39- Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena liviana hL1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 40 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana hL2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 41 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL2

SEQ ID NO: 42 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena hL2 liviana del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 43- Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena liviana hL2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 44 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3

SEQ ID NO: 45 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena liviana del anticuerpo humanizado hL3

SEQ ID NO: 46 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena hL3 liviana del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 47- Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena

liviana hL3 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 48 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana hL4 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 49 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena liviana hL4 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 50 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana hL4 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 51- Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena liviana hL4 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 52 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada hH1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 53 - Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada hH1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 54 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada hH1 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 55 - Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena hH1 pesada del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 56 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada hH2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 57 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena pesada hH2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 58 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada hH2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 59 - Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada hH2 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 60 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada hH3 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 61 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena pesada hH3 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 62 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada

hH3 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 63 - Secuencia de nucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada hH3 del anticuerpo humanizado

SEQ ID NO: 64 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana Trastuzumab

SEQ ID NO: 65 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada Trastuzumab

SEQ ID NO: 66 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo anti-LPS (h#1G5-H1L1)

SEQ ID NO: 67 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-LPS (h#1G5-H1L1)

SEQ ID NO: 68 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo anti-TROP2 (hRS7)

SEQ ID NO: 69 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-TRPO2 (hRS7)

SEQ ID NO: 70 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo anti-CD98 (hM23-H1L1)

SEQ ID NO: 71 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD98 (hM23-H1L1)

SEQ ID NO: 72 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena liviana del variante Trastuzumab

SEQ ID NO: 73 - Secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del variante Trastuzumab

SEQ ID NO: 74 - Secuencia de nucleótidos que codifican la cadena pesada del variante Trastuzumab

SEQ ID NO: 75 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del variante Trastuzumab