

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 902 179**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2017** **PCT/US2017/047465**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018** **WO18035391**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017** **E 17758392 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.11.2021** **EP 3500574**

54 Título: **Compuestos de seco-ciclopropapirrolindol, conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos y métodos de elaboración y uso**

30 Prioridad:

19.08.2016 US 201662377052 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2022

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US y
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)

72 Inventor/es:

YANG, FUKANG;
ZHANG, QIAN;
SNYDER, LAWRENCE B.;
GANGWAR, SANJEEV y
BOGER, DALE L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 902 179 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de seco-ciclopropapirroloindol, conjugados de anticuerpo-fármaco de los mismos y métodos de elaboración y uso

Referencia a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de Ser. 62/377.052, presentada el 19 de agosto de 2016.

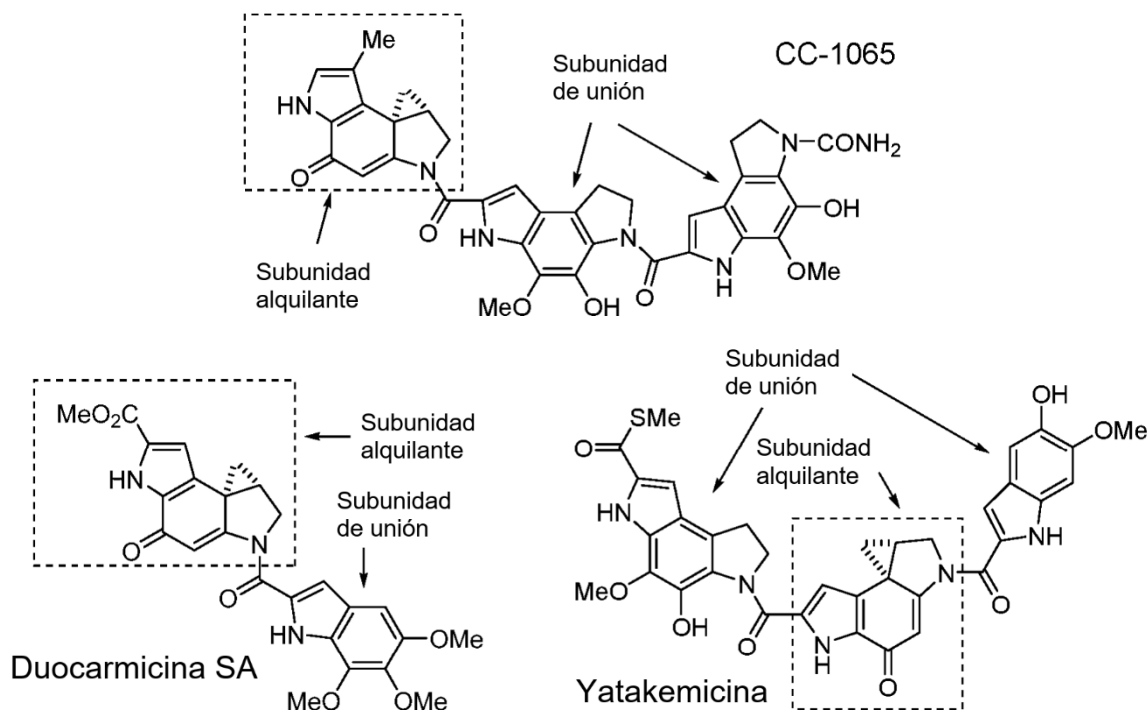
Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de seco-ciclopropapirroloindol, a conjugados de los mismos y a métodos para elaborar y usar dichos compuestos y conjugados.

El ADN de doble hélice tiene dos ranuras en espiral longitudinales que se extienden a lo largo de su exterior, muy parecidas a las rayas de un poste de barbería. Los dos surcos no son idénticos: uno, llamado surco mayor, es mucho más ancho que el otro, llamado surco menor.

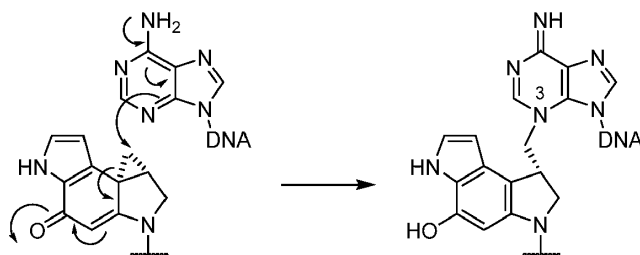
La anchura de la ranura menor es aproximadamente igual al grosor de un anillo de benceno. Muchas moléculas de unión a ADN biológicamente activas son moléculas poliaromáticas sustancialmente planas que tienen una huella arqueada, cuya forma les permite deslizarse cómodamente en el surco menor. Una clase de estas moléculas no solo se unen al ADN, sino que también lo alquilan y se conocen como aglutinantes-alquilantes de ADN de surco menor ("MGBA, por sus siglas en inglés").

Una subclase de MGBA se representa por los productos naturales CC-1065, duocarmicina SA y yatakemicina (Boger y Johnson 1995; Tichenor *et al.* 2007, Stephenson *et al.* 2015). (Las menciones completas de los documentos citados en el presente documento por el primer autor o inventor y el año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva). Comprenden una subunidad alquilante y una o más subunidades de unión, contribuyendo estas últimas a la unión al ADN pero sin reaccionar químicamente con este. En CC-1065 y duocarmicina SA, la subunidad alquilante está en un extremo de la molécula y la subunidad o subunidades de unión están en el otro extremo. En la yatakemicina, la subunidad alquilante está flanqueada por subunidades de unión. En consonancia con la arquitectura general de MGBA, las propias subunidades alquilantes y de unión son poliaromáticas y sustancialmente planas. Como la subunidad alquilante tiene una estructura central de ciclopropapirroloindol ("CPI"), los MGBA de esta subclase son compuestos CPI con el mismo nombre.

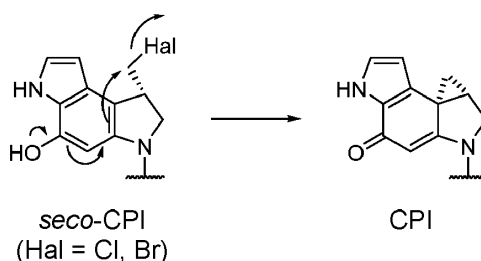


Tras la unión al ADN, el anillo de ciclopropilo CPI se activa y alquila el ADN en un nitrógeno adenina N3 (Hurley *et al.* 1984). Una teoría propuesta para explicar la activación es que la unión introduce una deformación conformacional adicional en el anillo de ciclopropilo ya deformado, aumentando su reactividad (Boger 2001; Boger *et al.* 1997; Tichenor

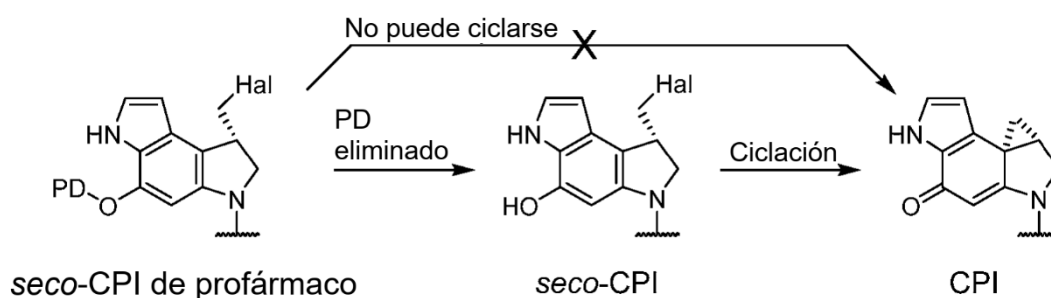
et al. 1997).



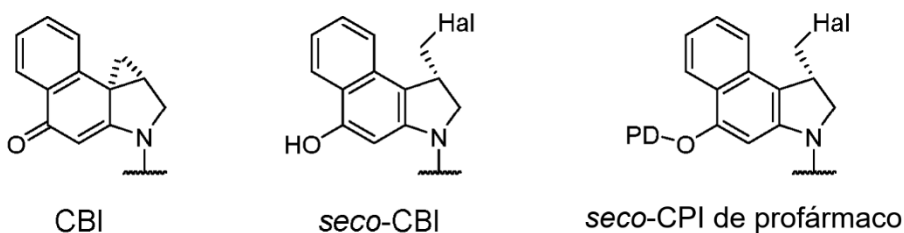
- 5 Los compuestos de *seco*-CPI son variantes de compuestos de CPI en los que el anillo ciclopropilo se ha abierto y se ha reemplazado por un grupo halometilo. Si bien los compuestos de *seco*-CPI por sí mismos no alquilan el ADN, pueden convertirse fácilmente *in vitro* o *in vivo* en compuestos de CPI y su actividad biológica es esencialmente la misma que la de estos últimos (Li *et al.* 2012). Por lo tanto, los compuestos de *seco*-CPI son de interés como equivalentes funcionales sintéticamente convenientes de los compuestos de CPI o como intermediarios para su síntesis (Boger *et al.* 2000).



- 15 Una ventaja de un compuesto de *seco*-CPI es que se puede ser un profármaco para controlar la conversión a la forma de CPI. La unión de un grupo de profármaco PD al grupo hidroxilo fenólico evita la conversión a la forma CPI a menos que el PD en primer lugar se elimine por escisión. El PD puede elegirse de manera que se escinda por un agente que se encuentra en o cerca del sitio de la acción biológica prevista, tal como un tumor, para reducir el riesgo de toxicidad sistémica. El PD es preferentemente un grupo escindible enzimáticamente, tal como un carbamato, fosfato, glucósido o glucurónido, que se pueden escindir mediante carboxiesterasa, fosfatasa, glucosidasa o glucuronidasa, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Kobayashi *et al.* 1994; Lajiness *et al.* 2010; Sufi *et al.* 2013; Tietze *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2014.



- 25 Los estudios sobre análogos de compuestos de CPI condujeron al desarrollo de otra subclase de MGBA, en la que el grupo pirrol de CPI se reemplaza por un anillo de benceno. Dichos compuestos se denominan compuestos de CBI, por el núcleo de ciclopropabenzindol ("CBI") de la subunidad alquilante. Al igual que los compuestos de CPI, los compuestos de CBI pueden existir en forma *seco* y *seco* de profármaco. La estructura de CBI más sencilla es más accesible sintéticamente y se ha demostrado que los compuestos de CBI son tanto estables como biológicamente potentes (Lajiness *et al.* 2010; Boger *et al.* 1990 y 1999).



Tanto los compuestos de CPI como de CBI son citotoxinas potentes, lo que los convierte en candidatos atractivos como agentes anticancerosos. Se han dedicado importantes esfuerzos de investigación a sintetizar y evaluar dichos compuestos y sus variantes *seco* para tal uso. Véanse, por ejemplo, Boger 2003; Kobayashi *et al.* 1994; Li *et al.* 1992; Nagamura y Saito 1998; Nagamura *et al.* 1996; Tichenor *et al.* 2007; Tietze *et al.* 2008.

Un tipo de agente anticanceroso que está generando un gran interés es un conjugado, en el que un fármaco se une a un agente de direccionamiento que se une a un ligando en la célula cancerosa. Por lo tanto, el agente de direccionamiento dirige el fármaco a la célula cancerosa, en la que se libera por uno de varios mecanismos para actuar sobre la célula cancerosa.

Un tipo común de conjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés, también denominado inmunoconjugado). En un ADC, un fármaco (también denominado agente terapéutico, citotoxina, carga útil u ojiva) se une covalentemente a un anticuerpo cuyo antígeno es un antígeno asociado a tumor, es decir, un antígeno expresado por una célula cancerosa.

El resto que une covalentemente el anticuerpo y el fármaco se denomina enlazador. Cuando cada anticuerpo tiene un fármaco unido, la estructura de un ADC se puede representar como:

[Anticuerpo]-[Enlazador]-[Fármaco]

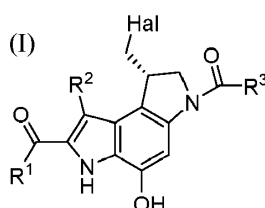
El anticuerpo, tras unirse al antígeno, suministra el ADC al sitio del cáncer. Allí, la escisión del enlazador o la degradación del anticuerpo libera el fármaco. Con frecuencia, el ADC se internaliza por endocitosis en la célula diana y la liberación del fármaco tiene lugar dentro de ella. Mientras el ADC circula en la sangre, el fármaco se mantiene inactivo debido a su enlace con el anticuerpo. En consecuencia, el fármaco en un ADC puede ser mucho más potente (citotóxico) que un agente de quimioterapia ordinario porque su liberación localizada reduce la toxicidad sistémica. Para obtener una revisión sobre los ADC, véase Schrama *et al.* 2006.

Se han propuesto compuestos de CPI y CBI, junto con sus equivalentes *seco*, como fármaco en un ADC. Véanse, por ejemplo, Boyd *et al.* 2008; Chari *et al.* 1995; Chen *et al.* 2014; Ducry *et al.* 2010; Gangwar *et al.* 2011; Ng *et al.* 2006, 2009 y 2011; Sufi *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2010.

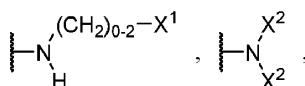
Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos de *seco*-CPI novedosos y muy potentes, que son adecuados para su uso como fármaco en un ADC u otro conjugado. Estos compuestos tienen un grupo amida unido al grupo pirrol de la subunidad *seco*-CPI y una o más subunidades de unión unidas a su otro extremo.

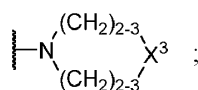
En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de *seco*-CPI que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



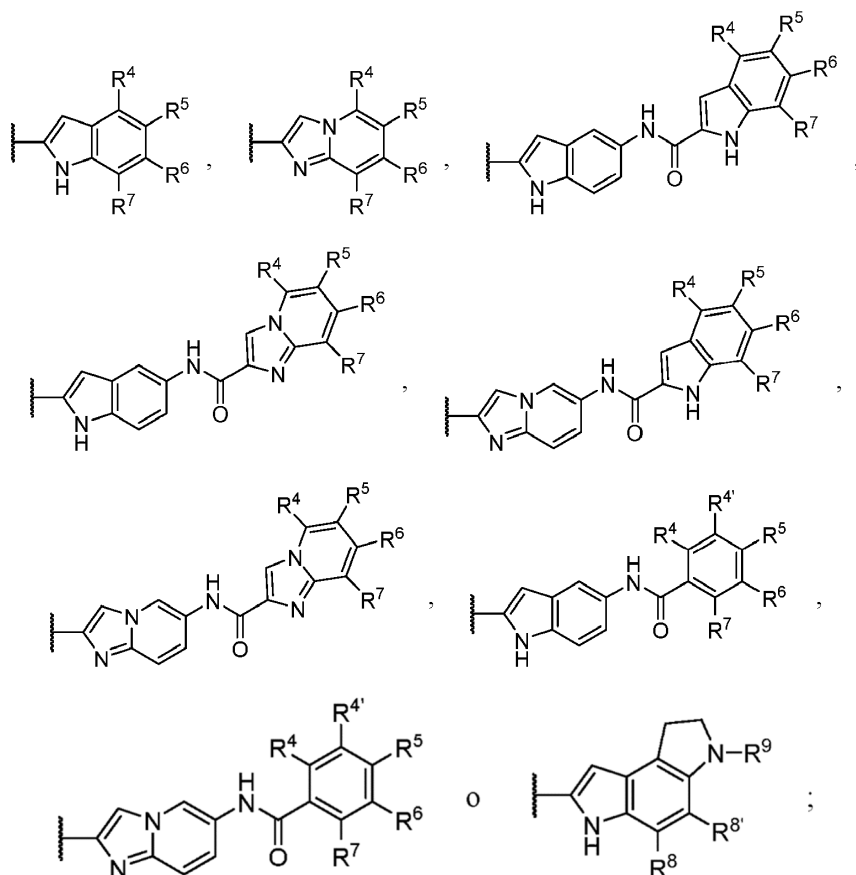
en la que
Hal es Cl o Br;
R¹ es



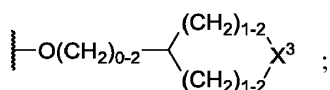
o



R² es H, alquilo C₁-C₃, CO₂H, CO₂(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquilo C₁-C₃) o C(=O)N(alquilo C₁-C₃)₂;
R³ es



R^4 , $R^{4'}$, R^5 , R^6 o R^7 son independientemente H, OMe, OH, un grupo arilo de 6 miembros (preferentemente fenilo), un grupo heteroarilo de 5 o 6 miembros, NH_2 , $NHMe$, NMe_2 , $NH(\text{alquilo } C_{2-4})$, $N(\text{alquilo } C_{2-4})_2$, $NHC(=O)X^1$, $O(\text{alquilo } C_{2-4})$, $O(CH_2)_{0-2}(\text{cicloalquilo } C_3-C_6)$, $O(CH_2)_{0-2}X^1$, o



en la que un grupo alquilo C_{2-4} puede estar sin sustituir o sustituido con OCH_2CH_2OH , $OCH_2CH_2NH_2$, $NHCH_2CH_2OH$, $NHCH_2CH_2NH_2$, OH o NH_2 y un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con alquilo C_1-C_2 , OH, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_1-C_2)$, $N(\text{alquilo } C_1-C_2)_2$, F, Cl, Br, NO_2 o CN; con la condición de que al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , R^6 y R^7 sea distinto de H;

R^8 y R^8 son independientemente H, OH, $O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, Cl, Br, F, $O(CH_2)_{2-4}NH_2$ u $O(CH_2)_{2-4}OH$; R^9 es H, $C(=O)(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $C(=O)NH_2$, $C(=O)NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $C(=O)(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $(CH_2)_{2-4}OH$, $(CH_2)_{2-4}O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ o $(CH_2)_{2-4}N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$; cada X^1 es independientemente un grupo arilo de 6 miembros (preferentemente fenilo) o un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros que está sin sustituir o sustituido con alquilo C_1-C_3 , OH, $O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, F, Cl, Br, NO_2 o CN; cada X^2 es independientemente H, Me o un grupo alquilo C_{2-4} que puede estar sin sustituir o sustituido con OCH_2CH_2OH , $OCH_2CH_2NH_2$, $NHCH_2CH_2OH$, $NHCH_2CH_2NH_2$, OH o NH_2 ; y cada X^3 es independientemente O, NH, $N(\text{alquilo } C_1-C_3)$ o S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de seco-CPI de la presente invención unido a un enlazador, adecuado para la conjugación con un resto de direccionamiento, especialmente un anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de un compuesto de seco-CPI de la presente invención conjugado a través de un enlazador a un resto de direccionamiento, especialmente un anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con esta invención, o un conjugado del mismo con un anticuerpo para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización preferida, el cáncer tratado

es cáncer de pulmón, gástrico, de ovario o colon.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de *seco-CPI* de la presente invención, o un conjugado del mismo con un anticuerpo, para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer. El cáncer puede ser cáncer de pulmón, gástrico, de ovario o colon.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B muestran un esquema para la síntesis de una estructura central de *seco-CPI* que puede usarse para elaborar los compuestos de la presente invención.

Las figuras 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 muestran esquemas de ejemplo para la síntesis de compuestos de *seco-CPI* de la presente invención. Los expertos en la materia apreciarán que, en algunos casos, los esquemas difieren principalmente en el orden en el que se ensamblan diversos segmentos de un compuesto o en el orden en que se eliminan los grupos protectores, y que el orden de ejecución de estas etapas puede ser una cuestión de preferencia individual.

Las figuras 3A, 3B y 5 muestran esquemas de ejemplo para la síntesis de compuestos enlazadores de *seco-CPI* de la presente invención. De nuevo, los expertos en la materia apreciarán que las variaciones en el orden de ejecución de determinadas etapas pueden estar sujetas a las preferencias individuales.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o variantes monocatenarias de los mismos. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L o V_k) y una región constante de cadena ligera que comprende un solo dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones marco más conservadas (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un antígeno X si el anticuerpo se une al antígeno X con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, más preferentemente de 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente de 6×10^{-9} M o menos, más preferentemente de 3×10^{-9} M o menos, incluso más preferentemente de 2×10^{-9} M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. La región constante de cadena pesada se puede genomanipular para afectar al tipo o extensión de la glucosilación, para prolongar la semivida del anticuerpo, para mejorar o reducir las interacciones con las células efectoras o el sistema del complemento, o para modular alguna otra propiedad. La genomanipulación se puede lograr mediante el reemplazo, la adición o la eliminación de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio con un dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de los anteriores.

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

Un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del antígeno X). Sin

embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de antígeno X de otras especies. En determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado se une específicamente al antígeno X humano y no reacciona de forma cruzada con otros antígenos X del antígeno (no humano). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

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

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

"Anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión, que tiene regiones variables en las que tanto la región marco como las regiones CDR se obtienen a partir de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada.

"Alifático" significa un resto hidrocarburo no aromático, saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificada que tiene el número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, como en "alifático C₃", "alifático C₁₋₅", "alifático C_{1-C5}", o "alifático C_i a C₅", siendo las últimas tres expresiones sinónimas de un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados). Se aplica un entendimiento similar al número de carbonos en otros tipos, como en alqueno C₂₋₄, cicloalifático C_{4-C7}, etc. En una vena similar, un término como "(CH₂)₁₋₃" debe entenderse como abreviatura del subíndice que es 1, 2 o 3, de modo que dicho término representa CH₂, CH₂CH₂ y CH₂CH₂CH₂.

"Alquilo" significa un resto alifático saturado, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquilo C_{1-C4} incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, *t*-butilo, 1-butilo, 2-butilo y similares. "Alquileo" significa un equivalente divalente de un grupo alquilo, tal como CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ y CH₂CH₂CH₂CH₂.

"Alquenilo" significa un resto alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquenilo C_{2-C4} incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, E- (o Z-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.

"Alquinilo" significa un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los grupos alquinilo C_{2-C4} incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.

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

"Heterocicloalifático" significa un resto cicloalifático en el que, en al menos un anillo del mismo, se han reemplazado hasta tres (preferentemente de 1 a 2) carbonos por un heteroátomo seleccionado independientemente de N, O o S, en el que N y S opcionalmente se pueden oxidar y N opcionalmente se puede cuaternizar. Los restos cicloalifáticos preferidos consisten en un anillo, de 5 a 6 miembros de tamaño. De manera similar, "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo" y "heterocicloalquinilo" significan un resto cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en el que al menos un anillo del mismo se ha modificado así. Los restos heterocicloalifáticos de ejemplo incluyen aziridinilo, azetidínilo, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotipiranilo, tetrahidrotipiranil sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfóxido,

tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo similares. "Heterocicloalquileo" significa un equivalente divalente de un grupo heterocicloalquileo.

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

"Halógeno" o "halo" significan flúor, cloro, bromo o yodo, a menos que tengan un significado más restringido.

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

"Heteroarilo" significa un resto que tiene un sistema anular mono, bi o tricíclico (preferentemente monocíclico de 5 a 7 miembros) en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O o S, en el que el N y el S pueden oxidarse opcionalmente y el N opcionalmente puede estar cuaternizado. Dicho anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo puede condensarse con otros tipos de anillos (como en benzofuranilo o tetrahidroisoquinolilo) o unirse directamente a otros tipos de anillos (como en fenilpiridilo o 2-ciclopentilpiridilo). A modo de ilustración adicional, los restos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares. "Heteroarileno" significa un equivalente divalente de un grupo heteroarilo.

Cuando se indique que un resto puede estar sustituido, tal como mediante el uso de las expresiones "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido" como en "alquilo C₁-C₅ sin sustituir o sustituido" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", dicho resto puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, preferentemente en un número de uno a cinco, más preferentemente en un número de uno o dos. Los sustituyentes y los patrones de sustitución pueden seleccionarse por un experto en la materia, teniendo en cuenta el resto al que está unido el sustituyente, para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse mediante técnicas conocidas en la materia, así como la métodos expuestos en el presente documento. Cuando un resto se identifica como "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido", en una realización preferida, dicho resto no está sustituido.

"Arientalquilo", (heterocicloalifático)alquilo", "arilalqueno", "arilalquino", "biarilalquilo", y similares significan un resto alquilo, alqueno o alquino, según sea el caso, sustituido con un resto arilo, heterocicloalifático, biarilo, etc., según sea el caso, con la valencia abierta (insatisfecha) en el resto alquilo, alqueno o alquino, por ejemplo, como en bencilo, fenetilo, N-imidazoiletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, "alquilarilo", "alquencilcicloalquilo" y similares significan un resto arilo, cicloalquilo, etc., según sea el caso, sustituido con un resto alquilo, alqueno, etc., según sea el caso, por ejemplo, como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. "Hidroxi-alquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo" y similares significan un resto alquilo, arilo, etc., según sea el caso, sustituido con con uno o más del sustituyente identificado (hidroxilo, halo, etc., según sea el caso).

Por ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, pero sin limitación, alquilo (especialmente metilo o etilo), alqueno (especialmente alilo), alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (especialmente flúor), haloalquilo (especialmente trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (especialmente hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo) (especialmente -OCF₃), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo), -SO₂N(alquilo)₂ y similares.

Cuando el resto que está sustituido es un resto alifático, los sustituyentes preferidos son arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes más preferidos son halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -

OC(=O)(alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂ y -NHC(=NH)NH₂. Se prefieren especialmente fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, alquilo C₁-C₄, O(alquilenilo C₂-C₄)OH y O(alquilenilo C₂-C₄)halo.

Cuando el resto que está sustituido es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, los sustituyentes preferidos son alquilo, alquilenilo, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes más preferidos son alquilo, alquilenilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂ y -NHC(=NH)NH₂. Se prefieren especialmente alquilo C₁-C₄, ciano, nitro, halo y alcoxi C₁-C₄.

Cuando se indica un intervalo, como en "alquilo C₁-C₅" o "del 5 al 10 %", dicho intervalo incluye los puntos extremos del intervalo, como en C₁ y C₅ en el primer caso y el 5 % y el 10 % en el segundo caso.

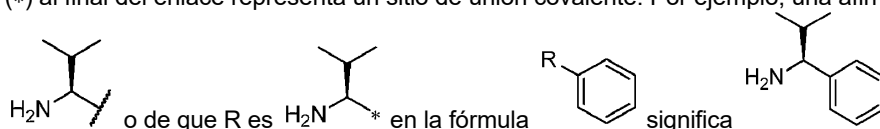
A menos que se indiquen específicamente estereoisómeros particulares (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro relevante en una fórmula estructural, mediante la representación de un doble enlace con configuración E o Z en una fórmula estructural, o mediante el uso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

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

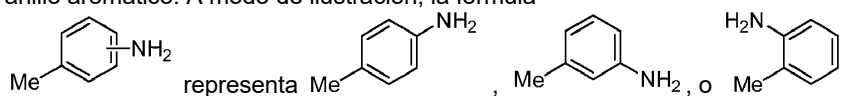
"Éster farmacéuticamente aceptable" significa un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto precursor o una sal del mismo o tiene *per se* una actividad similar a la del compuesto precursor. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C₁-C₅, alquilenilo C₂-C₅ o alquino C₂-C₅, especialmente metilo, etilo o n-propilo.

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

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



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



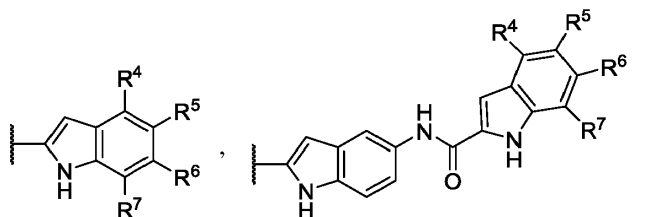
COMPUESTOS DE SECO-CPI

En la fórmula (I) y otras fórmulas en las que estas variables están presentes, se aplican las siguientes realizaciones preferidas, ya sea individualmente o en combinación con otras realizaciones preferidas, a menos que el contexto indique una realización preferida diferente o sea aplicable una combinación de realizaciones preferidas:

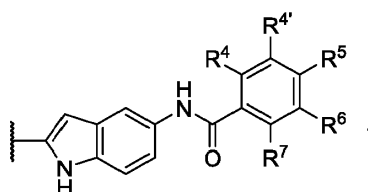
(i) Hal es Cl.

(ii) R^2 es H.

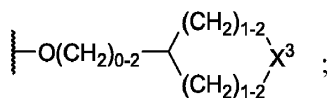
(iii) R^3 es



o

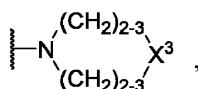


(iv) R^5 es OMe, OH, fenilo, NH_2 , NMe, NMe₂, NH(alquilo C₂-C₄), N(alquilo C₂-C₄)₂, NHC(=O)X¹, O(alquilo C₂-C₄), O(CH₂)₀₋₂(cicloalquilo C₃-C₆), O(CH₂)₀₋₂X¹, o

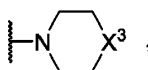


en la que un grupo alquilo C₂-C₄ puede estar sin sustituir o sustituido con OCH₂CH₂OH, OCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂OH, NHCH₂CH₂NH₂, OH o NH₂ y un grupo fenilo puede estar sustituido con alquilo C₁-C₂, OH, NH₂, NH(alquilo C₁-C₂), N(alquilo C₁-C₂)₂, F, Cl, Br, NO₂ o CN; (es decir, R^5 es uno de R⁴, R⁴, R⁵, R⁶ o R⁷ que es distinto de H).

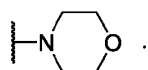
(v) R^1 es



más preferentemente es



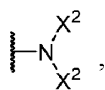
y mucho más preferentemente es



(vi) No más de tres, y más preferentemente no más de dos, de R⁴, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ son distintos de H.

(vii) El grupo arilo o heteroarilo en X¹ es fenilo, pirrolilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, piridazinilo o pirazinilo; más preferentemente, fenilo y especialmente fenilo sustituido con NH₂ u OH.

(viii) Cuando R¹ es



al menos un X² es distinto de H.

5

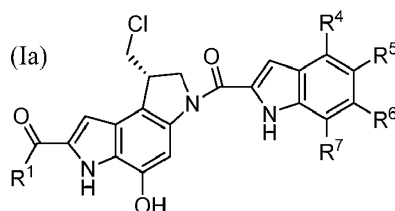
Con respecto a la preferencia (iii) anterior, R³ es más preferentemente



10 incluso más preferentemente donde cada uno de R⁴, R⁶ y R⁷ es H.

En un aspecto preferido de la invención, los compuestos de acuerdo con la fórmula (I) tienen una estructura representada por la fórmula (Ia), en la que R¹, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ son como se definen con respecto a la fórmula (I) en la

15



Los ejemplos de compuestos de acuerdo con la fórmula (Ia) se enumeran en la Tabla I, siendo cada uno de R⁴, R⁶ y R⁷ H a menos que se indique de otro modo.

20

Tabla I - Compuestos de acuerdo con la fórmula (Ia)		
Comp. N.º	R ¹	R ⁵
Ia-01		
Ia-02		
Ia-03		
Ia-04		
Ia-05		
Ia-06		
Ia-07		
Ia-08		

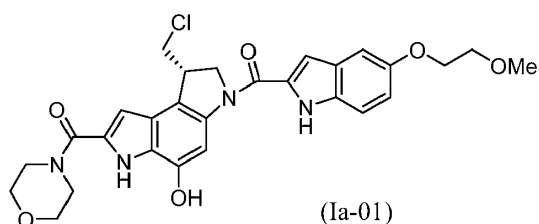
(continuación)

Tabla I - Compuestos de acuerdo con la fórmula (Ia)		
Comp. N.º	R ¹	R ⁵
Ia-09		
Ia-10		
Ia-11		
Ia-12		
Ia-13		
Ia-14		
Ia-15		
Ia-16		
Ia-17		
Ia-18		
Ia-19		
Ia-20		
Ia-21		
Ia-22		
Ia-23		
Ia-24		
Ia-25		

(continuación)

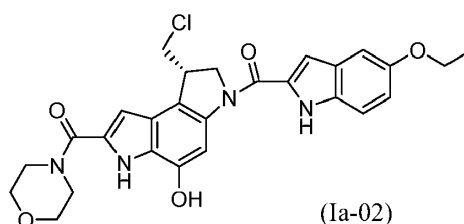
Tabla I - Compuestos de acuerdo con la fórmula (Ia)		
Comp. N.º	R ¹	R ⁵
Ia-26		
Ia-27		
Ia-28		
Ia-29		
Ia-30		 (R ⁴ = H, R ⁶ = R ⁷ = OMe)
Ia-31		

Un compuesto de seco-CPI preferido es (**Ia-01**), cuya estructura completa se muestra a continuación:



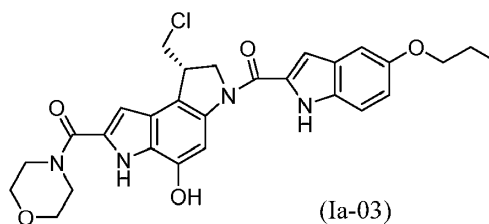
5

Un compuesto de seco-CPI preferido es (**Ia-02**), cuya estructura completa se muestra a continuación:



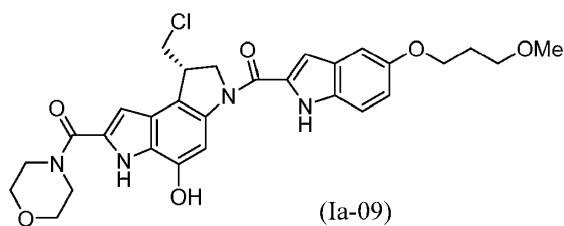
10

Un compuesto de seco-CPI preferido es (**Ia-03**), cuya estructura completa se muestra a continuación:

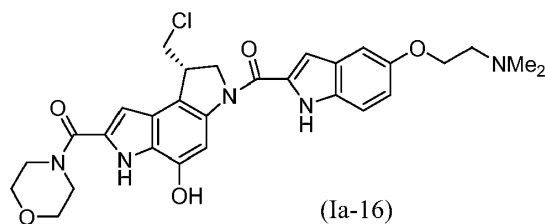


15

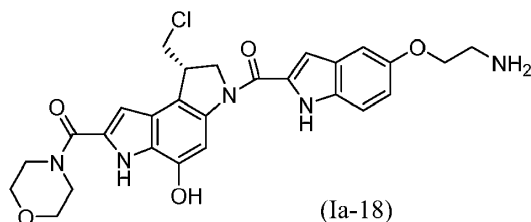
Un compuesto de seco-CPI preferido es (**Ia-09**), cuya estructura completa se muestra a continuación:



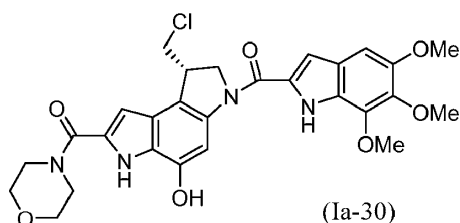
Un compuesto de seco-CPI preferido es **(Ia-16)**, cuya estructura completa se muestra a continuación:



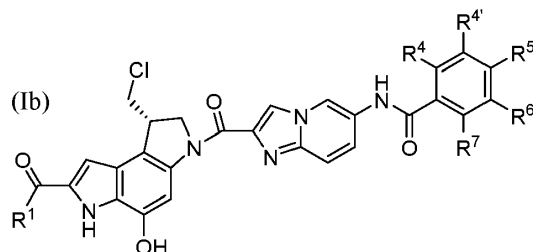
Un compuesto de seco-CPI preferido es **(Ia-18)**, cuya estructura completa se muestra a continuación:



Un compuesto de seco-CPI preferido es **(Ia-30)**, cuya estructura completa se muestra a continuación:



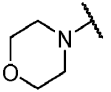
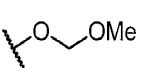
- 15 Otra realización preferida de compuestos de acuerdo con la fórmula **(I)** tiene una estructura representada por la fórmula **(Ib)**, en la que R^1 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 son como se definen con respecto a la fórmula **(I)** en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento:



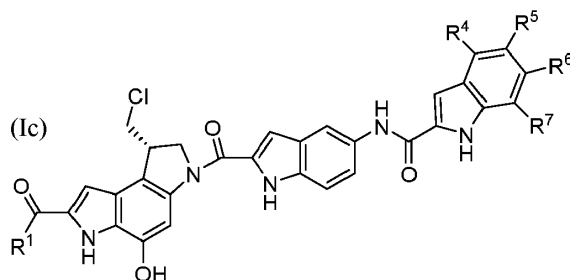
Los ejemplos de compuestos de acuerdo con la fórmula **(Ib)** se enumeran en la Tabla II (siendo cada uno de R^4 , R^4 , R^6 y R^7 H).

Tabla II - Compuestos de acuerdo con la fórmula (Ib)		
Comp. N.º	R^1	R^5
Ib-01		

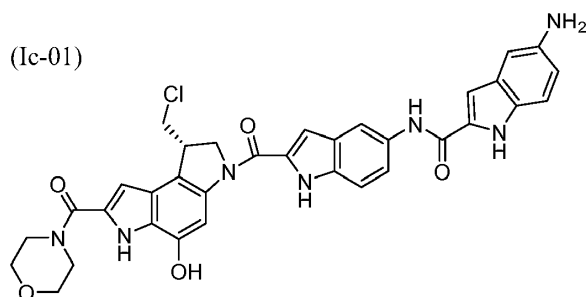
(continuación)

Tabla II - Compuestos de acuerdo con la fórmula (Ib)		
Comp. N.º	R ¹	R ⁵
Ib-02		

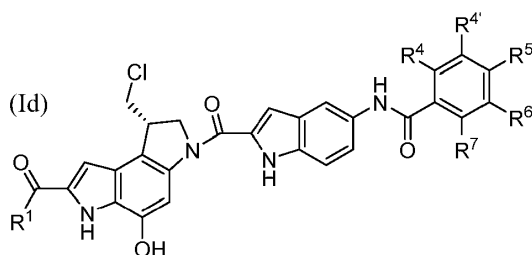
Otra realización preferida de compuestos de acuerdo con la fórmula (I) tiene una estructura representada por la fórmula (Ic), en la que R¹, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ son como se definen con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento:



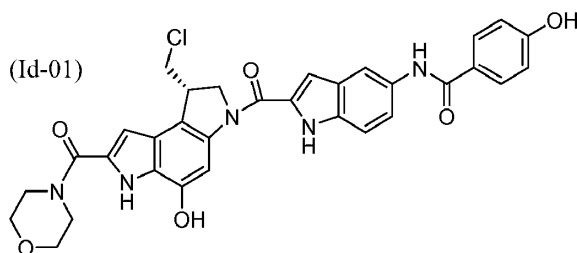
Un ejemplo de un compuesto (Ic) es el compuesto (Ic-01):

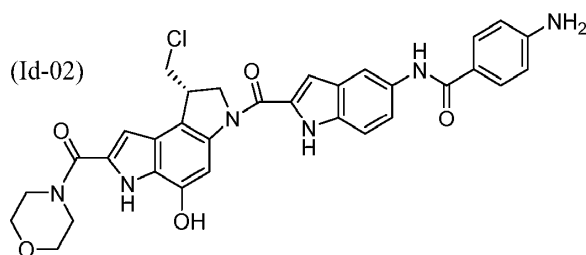


Otra realización de los compuestos (I) tiene una estructura representada por la fórmula (Id), en la que R¹, R⁴, R^{4'}, R⁵, R⁶ y R⁷ son como se definen con respecto a la fórmula (I) en la sección Breve resumen de la invención anteriormente en el presente documento:

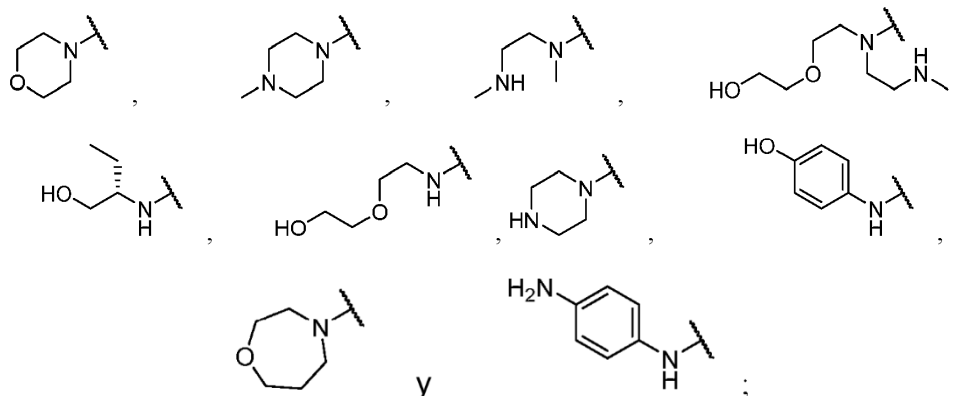


Los ejemplos de compuestos (Id) son (Id-01) y (Id-02):

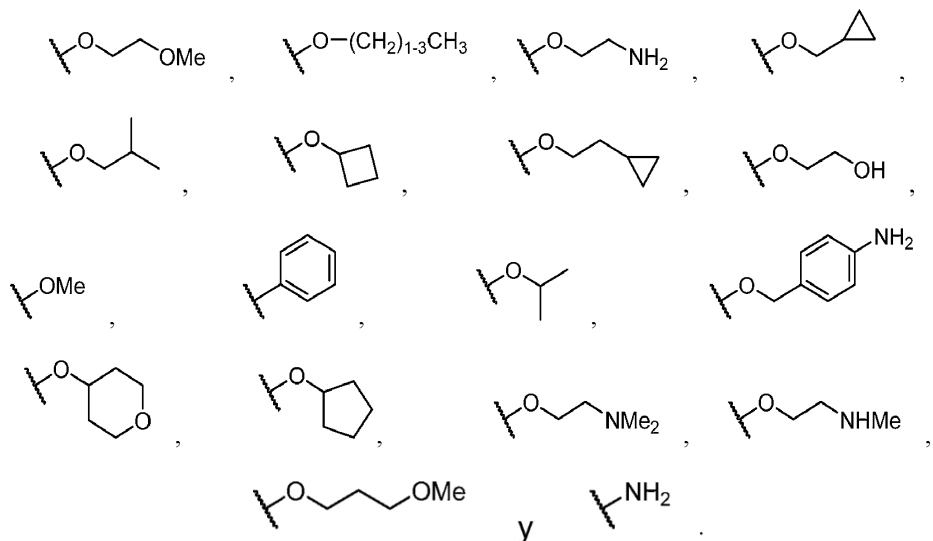




Las realizaciones preferidas específicas de R¹ son



y las realizaciones preferidas específicas de R^5 son



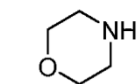
Sin quedar ligados a la teoría, se cree que los grupos R¹ de la presente invención son hidrófilos, lo que mejora ventajosamente sus propiedades. Tener un grupo R¹ de bajo CLogP puede ser ventajoso porque aumenta la solubilidad acuosa de un compuesto de seco-CPI y su construcción enlazadora. Como se indica en los Ejemplos 1 y 2 a continuación, la conjugación con un anticuerpo se realiza en un medio esencialmente acuoso y se puede conjugar de manera más eficaz un compuesto de seco-CPI-compuesto de enlazador más soluble. Además, en el caso de una escisión prematura no intencionada de un ADC que libera un compuesto de seco-CPI en la sangre, el aumento de la hidrofilia reduce la probabilidad de que el compuesto penetre a través de la membrana celular y provoque una toxicidad inespecífica. (La entrada de un ADC en una célula se produce mediante un proceso diferente: la endocitosis desencadenada por la unión del anticuerpo a su antígeno).

La valencia abierta en cada grupo R^1 , véase, por ejemplo, la Tabla I, está en un nitrógeno, de modo que forma un enlace amida con el grupo carboxilo del núcleo de *seco*-CPI. Su hidrofilia se puede estimar mediante la hidrofilia de las correspondientes aminas R^1H .

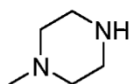
La hidrofilia (o, por el contrario, la hidrofobicidad) de un compuesto se puede estimar a partir de su CLogP, que es un

valor calculable a partir de su estructura: valores más bajos indican una molécula más hidrófila mientras que valores más altos indican una molécula más hidrófoba. A continuación se muestran los valores de CLogP para las aminas R¹H correspondientes a los grupos R¹ en la Tabla I. Los valores de CLogP son todos menores de 0,300, variando entre -1,484 y 0,248. (Los valores de CLogP se calcularon usando el software CHEMBIODRAW® Ultra (Versión 14.0.0.126) de PerkinElmer. (Se usó el mismo software para calcular los valores de CLogP mencionados en otra parte de la presente memoria descriptiva).

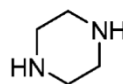
5



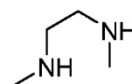
CLogP: -0,408



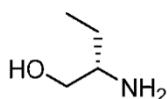
CLogP: -0,238



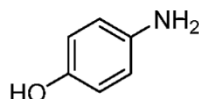
CLogP: -1,484



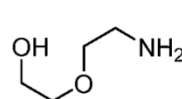
CLogP: -0,612



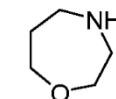
CLogP: -0,4572



CLogP: 0,248

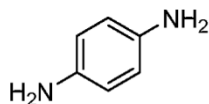


CLogP: -1,2308

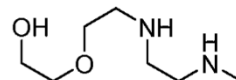


CLogP: -0,377

10



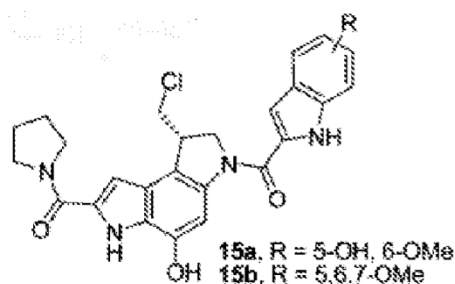
CLogP: -0,312



CLogP: -1,0202

A modo de comparación, Tichenor *et al.* 2007 desvelan los compuestos **15a** y **15b** que tienen una pirrolodinilamida unida a un núcleo de *seco-CPI*, pero el valor de CLogP para la amina correspondiente (pirrolina) es significativamente mayor, 0,376.

15



CLogP: 0,376

Por lo tanto, en una realización, los grupos R¹ son aquellos cuya amina correspondiente R¹H tiene un valor de CLogP de menos de 0,300, según lo calculado usando el software CHEMBIODRAW™ mencionado anteriormente.

20

CONJUGADOS

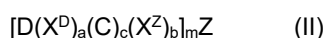
25 General

Los compuestos de *seco-CPI* de la presente invención pueden usarse como agentes terapéuticos *per se*, pero preferentemente se usan en conjugados. Más preferentemente, el resto de direccionamiento en el conjugado es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo y su antígeno es un antígeno asociado a un tumor, es decir, uno que se expresa por una célula cancerosa. Preferentemente, el antígeno asociado al tumor se expresa o sobreexpresa de forma única por la célula cancerosa, en comparación con una célula normal. El antígeno asociado al tumor se puede ubicar en la superficie de la célula cancerosa o secretarse por la célula cancerosa en sus alrededores.

30

Por lo tanto, otra realización de la presente invención es un conjugado que comprende el compuesto de *seco-CPI* de la presente invención y un ligando, representado por la fórmula (II)

35



en la que Z es un resto de direccionamiento, D es un compuesto de *seco-CPI* de la presente invención, y $-(X^D)_aC(X^Z)_b$ se denominan colectivamente un "resto enlazador" o "enlazador" porque unen Z y D. Dentro del enlazador, C es un grupo escindible diseñado para escindirse en o cerca del sitio de la acción biológica pretendida de D; X^D y X^Z son restos espaciadores (o "espaciadores") que separan D y C y C y Z, respectivamente; los subíndices a, b y c son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de X^D, X^Z y C es opcional). El subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 1, 2, 3 o 4). D, X^D, C, X^Z y Z se describen más detalladamente a continuación en el presente

40

documento.

Al unirse a un tejido o célula diana donde se encuentra su antígeno o receptor, Z dirige el conjugado allí. La escisión del grupo C en el tejido o la célula diana libera D para ejercer su efecto citotóxico localmente. En algunos casos, el conjugado se internaliza en una célula diana mediante endocitosis y la escisión tiene lugar dentro de la célula diana. De esta manera, se logra el suministro preciso de D en el sitio de la acción prevista, reduciendo la dosis necesaria. Además, D es normalmente biológicamente inactivo (o significativamente menos activo) en su estado conjugado, reduciendo así la toxicidad no deseada contra tejido o células no diana.

Como refleja el subíndice m, cada Z puede conjugarse con más de un D, dependiendo del número de sitios que Z tenga disponibles para la conjugación y las condiciones experimentales empleadas. Los expertos en la materia apreciarán que, mientras que cada Z individual se conjuga con un número entero de D, una preparación del conjugado puede analizar una relación no entera de D a Z, lo que refleja un promedio estadístico. Esta relación se denomina relación de sustitución ("SR, por sus siglas en inglés") o relación de fármaco-anticuerpo ("DAR, por sus siglas en inglés").

Resto de direccionamiento Z

Preferentemente, el resto de direccionamiento Z es un anticuerpo. Para mayor conveniencia y brevedad y no a modo de limitación, el análisis detallado en la presente memoria descriptiva sobre Z y sus conjugados se escribe en el contexto de que es un anticuerpo, pero los expertos en la materia entenderán que se pueden conjugar otros tipos de Z, *mutatis mutandis*. Por ejemplo, los conjugados con ácido fólico como resto de direccionamiento pueden dirigirse a células que tienen el receptor de folato en sus superficies (Leamon *et al.*, Cancer Res. 2008, 68 (23), 9839). Por las mismas razones, el análisis detallado en la presente memoria descriptiva se describe principalmente en términos de una relación 1:1 de Z a D ($m = 1$).

Preferentemente, Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado a un tumor, que permite el direccionamiento selectivo de las células cancerosas. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen: mesotelina, antígeno de membrana específico de la próstata (AMEP), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina cinasa 7 (PTK7), glipicano-3, RG1, fucosilo-GM1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. El anticuerpo es preferentemente monoclonal, especialmente un anticuerpo humano monoclonal. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente se describe en Korman *et al.*, documento US 8.609.816 B2 (2013; B7H4, también conocido como O8E; en particular los anticuerpos 2A7, 1G11 y 2F9); Rao-Naik *et al.*, documento 8.097.703 B2 (2012; CD19; en particular los anticuerpos 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 y 3C10); King *et al.*, documento US 8.481.683 B2 (2013; CD22; en particular los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6); Keler *et al.*, documento US 7.387.776 B2 (2008; CD30; en particular los anticuerpos 5F11, 2H9 y 17G1); Terrett *et al.*, documento US 8.124.738 B2 (2012; CD70; en particular los anticuerpos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7); Korman *et al.*, documento US 6.984.720 B1 (2006; CTLA-4; en particular los anticuerpos 10D1, 4B6 y 1E2); Vistica *et al.*, documento US 8.383.118 B2 (2013, fucosilo-GM1, en particular los anticuerpos 5B1, 5B1a, 7D4, 7E4, 13B8 y 18D5); Korman *et al.*, documento US 8.008.449 B2 (2011; PD-1; en particular los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4); Huang *et al.*, documento US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, en particular los anticuerpos 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli *et al.*, documento US 7.875.278 B2 (2011; PSMA; en particular los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3); Terrett *et al.*, documento US 8.222.375 B2 (2012; PTK7; en particular los anticuerpos 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a y 7C8); Terrett *et al.*, documento US 8.680.247 B2 (2014; glipicano-3; en particular los anticuerpos 4A6, 11E7 y 16D10); Harkins *et al.*, documento US 7.335.748 B2 (2008; RG1; en particular los anticuerpos A, B, C y D); Terrett *et al.*, documento US 8.268.970 B2 (2012; mesotelina; en particular los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1); Xu *et al.*, documento US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; en particular los anticuerpos 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 y 1A9.A6.B9); Deshpande *et al.*, documento US 8.258.266 B2 (2012; IP10; en particular los anticuerpos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S y 13C4); Kuhne *et al.*, documento US 8.450.464 B2 (2013; CXCR4; en particular los anticuerpos F7, F9, D1 y E2); y Korman *et al.*, documento US 7.943.743 B2 (2011; PD-L1; en particular los anticuerpos 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4).

Además de ser un anticuerpo, Z también puede ser un fragmento de anticuerpo (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o Fv) o mimético de anticuerpo, tal como un aficuerpo, un dominio de anticuerpo (dAb), un nanocuerpo, un monocuerpo, una DARPin, una anticalina, un versacuerpo, una duocalina, una lipocalina o un avímero.

Cualquiera de varios grupos reactivos diferentes en Z puede ser un sitio de conjugación, incluyendo grupos ε-amino en residuos de lisina, restos de carbohidratos colgantes, grupos de ácido carboxílico en cadenas laterales de ácido aspártico o glutámico, grupos cisteína-disulfuro de cisteína y grupos tiol de cisteína. Para revisiones sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para conjugación, véanse, por ejemplo, Garnett, Adv. Drug Delivery Rev. 2001, 53, 171-216 y Dubowchik y Walker, Pharmacology & Therapeutics 1999, 83, 67-123.

La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples residuos de lisina, que pueden conjugarse mediante sus grupos ε-amino a través de enlaces amida, urea, tiourea o carbamato.

En otra realización, Z puede conjugarse a través de una cadena lateral de carbohidrato, ya que muchos anticuerpos están glucosilados. La cadena lateral de carbohidrato se puede oxidar con peryodato para generar grupos aldehído, que a su vez se pueden hacer reaccionar con aminas para formar un grupo imina, tal como en una semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina se puede convertir en un grupo amina más estable mediante reducción con cianoborohidruro de sodio. Para divulgaciones adicionales sobre la conjugación a través de cadenas laterales de carbohidrato, véase, por ejemplo, Rodwell *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83, 2632-2636 (1986).

En otra realización, Z puede conjugarse a través un ácido carboxílico de cadena lateral de ácido aspártico o glutámico, por ejemplo, mediante conversión en una carbohidrazida, que a continuación se hace reaccionar con un enlazador que lleva aldehído. Véase Fisch *et al.*, Bioconjugate Chemistry 1992, 3, 147-153.

Se puede usar un grupo tiol (-SH) en la cadena lateral de una cisteína para formar un conjugado mediante varios métodos. Puede usarse para formar un enlace disulfuro entre este y un grupo tiol en el enlazador. Otro método es a través de su adición de Michael a un grupo maleimida en el enlazador.

Normalmente, aunque los anticuerpos tienen residuos de cisteína, carecen de grupos tiol libres porque todas sus cisteínas están acopladas en enlaces disulfuro intracatenarios o intercatenarios. Para generar un grupo tiol libre, se puede reducir un grupo disulfuro nativo. Véanse, por ejemplo, Packard *et al.*, Biochemistry 1986, 25, 3548; King *et al.*, Cancer Res. 1994, 54, 6176; y Doronina *et al.*, Nature Biotechnol. 2003, 21, 778. Como alternativa, se puede introducir una cisteína que tenga un grupo -SH libre mutando el anticuerpo, sustituyendo una cisteína por otro aminoácido o insertando una en la cadena polipeptídica. Véanse, por ejemplo, Eigenbrot *et al.*, documento US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti *et al.*, Bioconjugate Chem. 1994, 5, 504; Urmovitz *et al.*, documento US 4.698.420 (1987); Stimmel *et al.*, J. Biol. Chem. 2000, 275, 30445; Bam *et al.*, documento US 7.311.902 B2 (2007); Kuan *et al.*, J. Biol. Chem. 1994, 269, 7610; Poon *et al.*, J. Biol. Chem. 1995, 270, 8571; Junutula *et al.*, Nature Biotechnology 2008, 26, 925 y Rajpal *et al.*, Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/270245, presentada el 21 de diciembre de 2015. Aún en otro enfoque, se añade una cisteína al extremo C de la cadena pesada de la cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Liu *et al.*, documento US 8.865.875 B2 (2014); Cumber *et al.*, J. Immunol. 1992, 149, 120; King *et al.*, Cancer Res. 1994, 54, 6176; Li *et al.*, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 985; Yang *et al.*, Protein Engineering 2003, 16, 761; y Olafson *et al.*, Protein Engineering Design & Selection 2004, 17, 21.

Enlazadores y sus componentes

Como se ha señalado anteriormente, el enlazador comprende hasta tres elementos: un grupo C escindible y espaciadores opcionales X^Z y X^D.

El grupo C se puede escindir en condiciones fisiológicas. Preferentemente, es relativamente estable mientras el conjugado está en circulación en la sangre, pero se escinde fácilmente una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción pretendido, cerca, en o dentro de la célula diana. Preferentemente, el conjugado es internalizado por una célula diana tras la unión de un anticuerpo Z a un antígeno presentado en la superficie de la célula diana. Posteriormente, se produce la escisión de C en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

En una realización, C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo es ligeramente superior al neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, aproximadamente 5. Por lo tanto, un C sensible al ácido se escindirá a un ritmo varios órdenes de magnitud más rápido dentro de un lisosoma que en la sangre. Los ejemplos de grupos sensibles a los ácidos son cis-aconitilamidas e hidrazonas, como se describe en Shen *et al.*, documento US 4.631.190 (1986); Shen *et al.*, documento US 5.144.011 (1992); Shen *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981, 102, 1048; y Yang *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 1988, 85, 1189.

En otra realización, C es un disulfuro. Los disulfuros se pueden escindir mediante un mecanismo de intercambio de tiol-disulfuro, a una velocidad que depende de la concentración de tiol ambiental. Como la concentración intracelular de glutatión y otros tioles es más alta que sus concentraciones séricas, la velocidad de escisión de un disulfuro será más alta intracelularmente. Además, la velocidad de intercambio de tiol-disulfuro se puede modular mediante el ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un disulfuro de alquil-arilo frente a un disulfuro de alquil-alquilo; sustitución en el anillo de arilo, etc.), lo que permite la diseño de enlaces disulfuro que tienen una estabilidad sérica mejorada o una velocidad de escisión particular. Véanse, por ejemplo, Thorpe *et al.*, Cancer Res. 2008, 48, 6396-6403; Santi *et al.*, documento US 7.541.530 B2 (2009); Ng *et al.*, documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng *et al.*, documento WO 2002/096910 A1; Boyd *et al.*, documento US 7.691.962 B2 (2010); y Sufi *et al.*, documento US 8.461.117 B2 (2013).

Un grupo C preferido es un péptido que se escinde selectivamente por una proteasa dentro de la célula diana, en oposición a una proteasa en el suero. Normalmente, el péptido comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente de 1 a 6 aminoácidos, más preferentemente de 2 a 3 aminoácidos. El aminoácido o aminoácidos pueden ser α -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos derivados de los mismos, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. En la presente memoria descriptiva, el término "aminoácido" también incluye miméticos y análogos de

aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general de $H_2N(R)CHCO_2H$ de un aminoácido natural, excepto que el grupo R no se encuentra entre los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina metil sulfonio. Un mimético de aminoácidos es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un α -aminoácido, pero que funciona de manera similar a uno. El aminoácido puede ser de la estereoquímica "L" de los aminoácidos codificados genéticamente, así como de la estereoquímica enantiomérica "D".

Preferentemente, C contiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa. Se conocen en la materia muchas secuencias de reconocimiento de escisión. Véanse, por ejemplo, Matayoshi *et al.* Science 247: 954 (1990); Dunn *et al.* Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah *et al.* Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber *et al.* Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith *et al.* Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); y Bouvier *et al.* Meth. Enzymol. 248: 614 (1995).

Para conjugados que no están destinados a ser internalizados por una célula, se puede elegir un grupo C de modo que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular en las proximidades de un cáncer, por ejemplo, una proteasa liberada por células cancerosas cercanas que mueren o una proteasa asociada a tumores secretada por células cancerosas. Las proteasas asociadas a tumores extracelulares de ejemplo son plasmina, metaloproteasas de matriz (MMP), timetoligopeptidasa (TOP) y CD10. Véanse, por ejemplo, Trouet *et al.*, documento US 7.402.556 B2 (2008); Dubois *et al.*, documento US 7.425.541 B2 (2008); y Bebbington *et al.*, documento US 6.897.034 B2 (2005).

Para los conjugados diseñados para ser internalizados por una célula, C comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosómica o lisosómica, especialmente la última. Los ejemplos no limitantes de dichas proteasas incluyen cathepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente cathepsina B. Los péptidos escindibles de cathepsina B de ejemplo incluyen Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit. (En el presente documento, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N a C, como en $H_2N-AA^2-AA^1-CO_2H$, a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Véanse Dubowchik *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 3341; Dubowchik *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 3347; y Dubowchik *et al.*, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855.

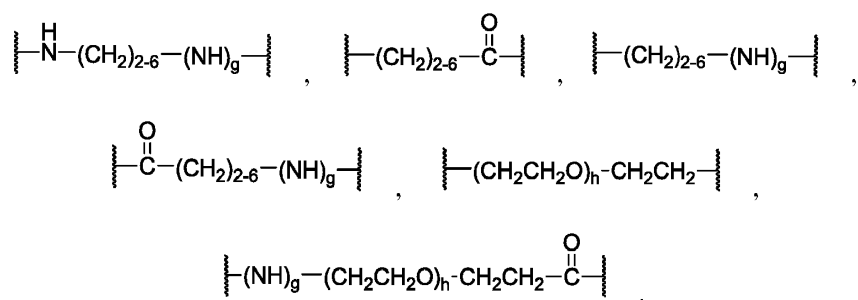
Otra enzima que se puede utilizar para escindir enlazadores de peptidilo es la legumaina, una cisteína proteasa lisosómica que se escinde preferentemente en Ala-Ala-Asn.

En una realización, el Grupo C es un péptido que comprende una secuencia de dos aminoácidos $-AA^2-AA^1-$, en la que AA^1 es lisina, arginina o citrulina y AA^2 es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra realización, C consiste en una secuencia de uno a tres aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser y Glu. Más preferentemente, es un péptido de dos a tres aminoácidos del grupo anterior.

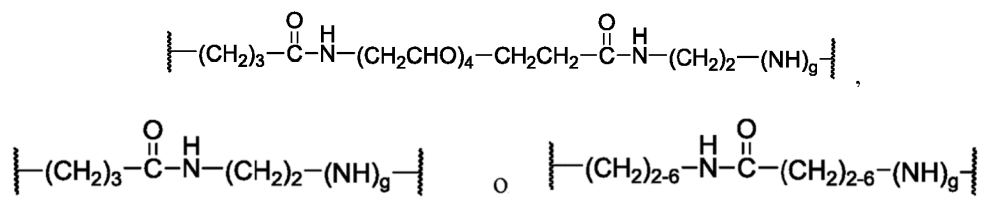
La preparación y el diseño de los grupos escindibles C que consisten en un único aminoácido se desvelan en Chen *et al.*, documento US 8.664.407 B2 (2014).

El grupo C se puede unir directamente a Z o D; es decir, los espaciadores X^Z o X^D , según sea el caso, pueden estar ausentes.

Cuando está presente, el espaciador X^Z proporciona separación espacial entre C y Z, para que el primero no interfiera estéricamente con la unión del antígeno por el último o el último interfiera estéricamente con la escisión del primero. Además, el espaciador X^Z se puede usar para conferir una mayor solubilidad o una disminución de las propiedades de agregación a los conjugados. Un espaciador X^Z puede comprender uno o más segmentos modulares, que se pueden ensamblar en cualquier número de combinaciones. Los ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X^Z son:



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



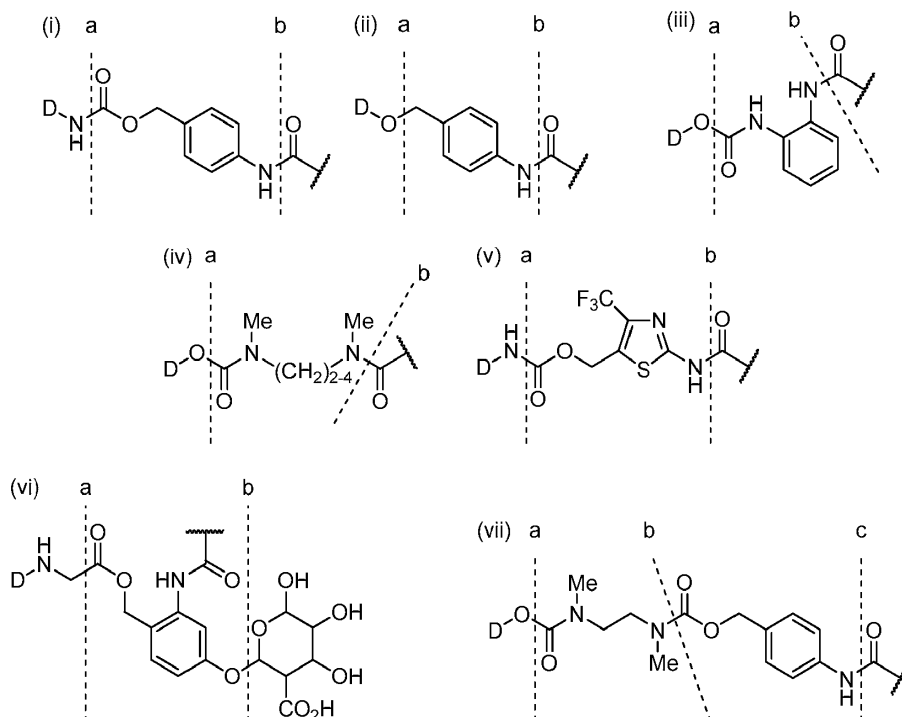
- 5 El espaciador X^D , si está presente, proporciona separación espacial entre C y D, para que este último no interfiera estérica o electrónicamente con la escisión del primero. El espaciador X^D también puede servir para introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en un conjugado. Generalmente, la masa y funcionalidad adicionales afectarán a la semivida en suero y otras propiedades del conjugado. Por lo tanto, a través de una selección juiciosa de grupos espaciadores, se puede modular la semivida media en suero de un conjugado. El espaciador X^D también se puede ensamblar a partir de segmentos modulares, de forma análoga a la descripción anterior para el espaciador X^Z .

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

- 15 El enlazador puede realizar otras funciones además de unir covalentemente el anticuerpo y el fármaco. Por ejemplo, el enlazador puede contener un grupo de poli(etilenglicol) ("PEG"). Dado que la etapa de conjugación implica normalmente acoplar un fármaco-enlazador a un anticuerpo en un medio acuoso, un grupo PEG puede mejorar la solubilidad acuosa del fármaco-enlazador. Además, un grupo PEG puede mejorar la solubilidad o reducir la agregación en el ADC resultante. Cuando está presente un grupo PEG, puede incorporarse en el espaciador X^Z de X^D , o en ambos. El número de unidades repetidas en un grupo PEG puede ser de 2 a 20, preferentemente entre 4 y 10.

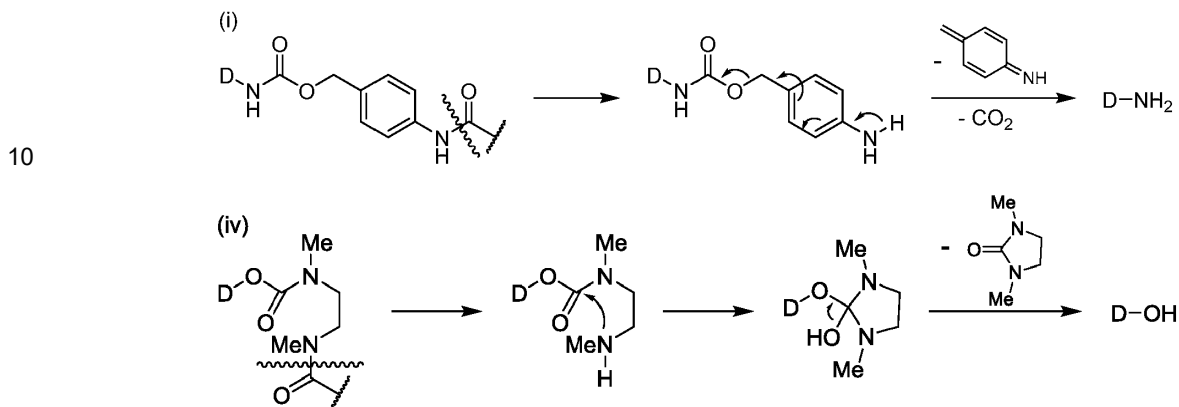
- 25 El espaciador X^Z o X^D , o ambos, pueden comprender un resto de autoinmolación. Un resto de autoinmolación es un resto que (1) está unido a C y Z o D y (2) tiene una estructura tal que la escisión del grupo C inicia una secuencia de reacción que da como resultado que el resto de autoinmolación se separe de Z o D, según sea el caso. En otras palabras, la reacción en un sitio distal de Z o D (escisión del grupo C) hace que el enlace $X^Z\text{---}Z$ o $X^D\text{---}D$ también se rompa. La presencia de un resto de autoinmolación es deseable en el caso del espaciador X^D porque, si, después de la escisión del conjugado, el espaciador X^D o una porción del mismo permaneciera unido a D, la actividad biológica de D puede verse afectada. El uso de un resto de autoinmolación es especialmente deseable cuando el grupo C escindible es un polipéptido, en cuyo caso el resto de autoinmolación normalmente se encuentra adyacente al mismo, para evitar que D interfiera estérica o electrónicamente con la escisión peptídica.

A continuación se muestran los restos de autoinmolación de ejemplo (i)-(v) unidos a un grupo hidroxilo o amino de D:



El resto de autoinmolación es la estructura entre las líneas discontinuas a y b (o las líneas discontinuas b y c), con

características estructurales adyacentes que se muestran para proporcionar contexto. Los restos de autoinmolación (i) y (v) están unidos a un D-NH₂ (es decir, la conjugación se realiza a través de un grupo amino), mientras que los restos de autoinmolación (ii), (iii) y (iv) están unidos a un D-OH (es decir, la conjugación se realiza mediante un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace en la línea discontinua b por una enzima, una peptidasa en el caso de las estructuras (i)-(v) y una β-glucuronidasa en el caso de la estructura (vi), inicia una secuencia de reacción de autoinmolación que da como resultado la escisión del enlace en la línea discontinua a y la consiguiente liberación de D-OH o D-NH₂, según sea el caso. A modo de ilustración, a continuación se muestran los mecanismos de autoinmolación de las estructuras (i) y (iv):



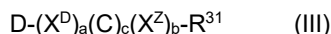
En otras palabras, la escisión de un primer enlace químico en una parte de un grupo de autoinmolación inicia una secuencia de etapas que da como resultado la escisión de un segundo enlace químico, el que conecta el grupo de autoinmolación con el fármaco, en una parte diferente del grupo de autoinmolación, liberando así el fármaco.

En algunos casos, los grupos de autoinmolación se pueden usar en tándem, como se muestra por la estructura (vii). En tal caso, la escisión en la línea discontinua c desencadena la autoinmolación del resto entre las líneas discontinuas b y c mediante una reacción de eliminación en 1,6, seguida de la autoinmolación del resto entre las líneas discontinuas a y b mediante una reacción de ciclación-eliminación. Para descripciones adicionales con respecto a restos de autoinmolación, véanse Carl *et al.*, J. Med. Chem. 1981, 24, 479; Carl *et al.*, documento WO 81/01145 (1981); Dubowchik *et al.*, Pharmacology & Therapeutics 1999, 83, 67; Firestone *et al.*, documento US 6.214.345 B1 (2001); Toki *et al.*, J. Org. Chem. 2002, 67, 1866; Doronina *et al.*, Nature Biotechnology 2003, 21, 778 (errata, pág. 941); Boyd *et al.*, documento US 7691962 B2; Boyd *et al.*, documento US 2008/0279868 A1; Sufi *et al.*, documento WO 2008/083312 A2; Feng, documento US 7.375.078 B2; Jeffrey *et al.*, documento US 8.039.273; y Senter *et al.*, documento US 2003/0096743 A1.

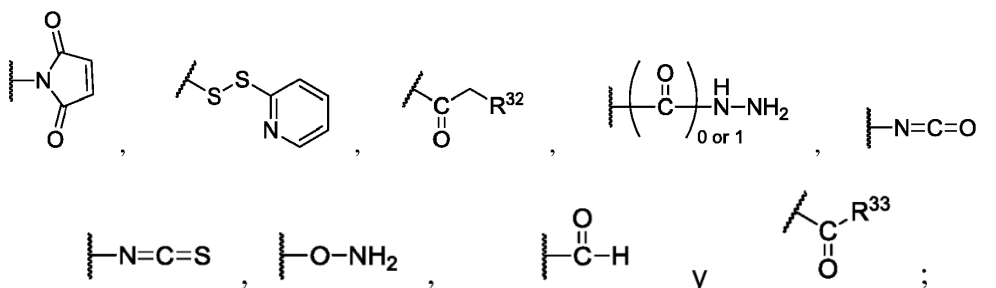
En otra realización, Z y D están unidos por un enlazador no escindible, es decir, C está ausente. El metabolismo de D eventualmente reduce el enlazador a un pequeño resto agregado que no interfiere con la actividad biológica de D.

Técnicas de conjugación

Los conjugados de la presente invención se elaboran preferentemente preparando primero un compuesto que comprende D y un enlazador (X^D)_a(C)_c(X^Z)_b (en el que X^D, C, X^Z, a, b y c son como se definen para la fórmula (II)) para formar el compuesto de fármaco-enlazador representado por la fórmula (III):

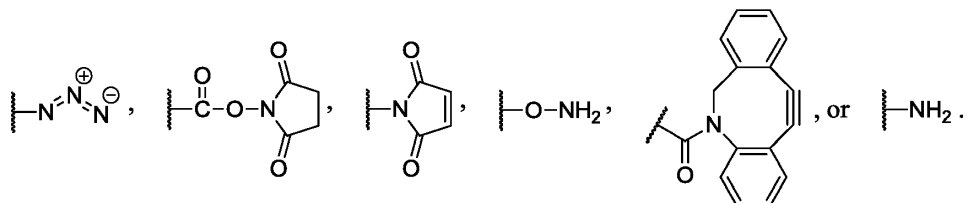


en la que R³¹ es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional complementario en Z para formar el conjugado. Los ejemplos de grupos R³¹ adecuados incluyen amino, azida, tiol, ciclooctina,



en los que R^{32} es Cl, Br, F, mesilato o tosilato y R^{33} es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimido, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo u -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente útil para la preparación de restos adecuados $D-(X^D)_aC(X^Z)_b-R^{31}$ se desvela en Ng *et al.*, documento US 7.087.600 B2 (2006); Ng *et al.*, documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng *et al.*, documento US 7.129.261 B2 (2006); Ng *et al.*, documento WO 02/096910 A1; Boyd *et al.*, documento US 7.691.962 B2; Chen *et al.*, documento US 7.517.903 B2 (2009); Gangwar *et al.*, documento US 7.714.016 B2 (2010); Boyd *et al.*, documento US 2008/0279868 A1; Gangwar *et al.*, documento US 7.847.105 B2 (2010); Gangwar *et al.*, documento US 7.968.586 B2 (2011); Sufi *et al.*, documento US 8.461.117 B2 (2013); y Chen *et al.*, documento US 8.664.407 B2 (2014).

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



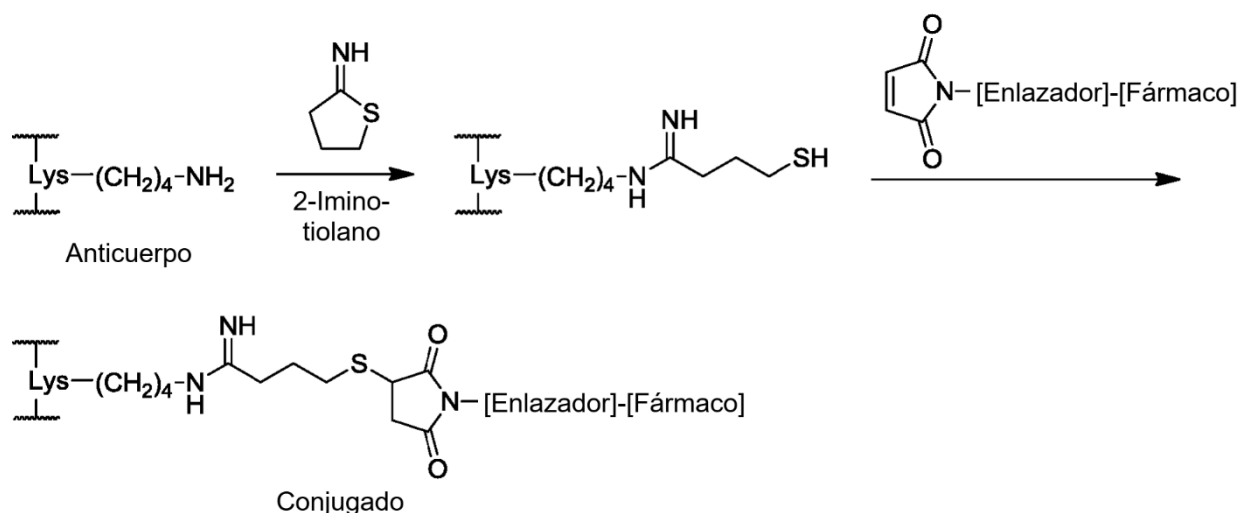
- 15 Un grupo $-OH$ se puede esterificar con un grupo carboxi en el anticuerpo, por ejemplo, en una cadena lateral de ácido aspártico o glutámico.

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

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

- 25 Se puede conjugar un grupo maleimida con un grupo $-SH$ en el anticuerpo (por ejemplo, de cisteína o de la modificación química del anticuerpo para introducir una funcionalidad sulfhidrido), en una reacción de adición de Michael.

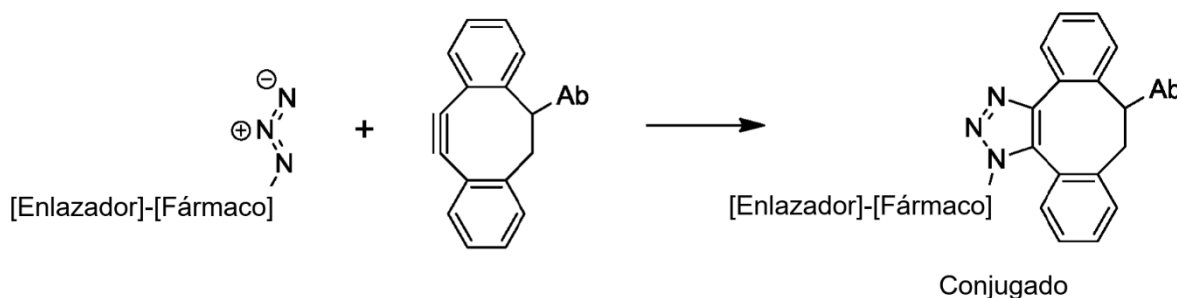
- 30 Cuando un anticuerpo no tiene una cisteína $-SH$ disponible para la conjugación, un grupo ϵ -amino en la cadena lateral de un residuo de lisina puede reaccionar con 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") para introducir un grupo tiol libre ($-SH$), creando un sustituto de cisteína, por así decirlo. El grupo tiol puede reaccionar con una maleimida u otro grupo aceptor de nucleófilos para efectuar la conjugación. El mecanismo se ilustra a continuación con 2-iminotiolano.



- 35 Normalmente, se alcanza un nivel de tiolación de dos a tres tioles por anticuerpo. Para conocer un procedimiento representativo, véase Cong *et al.*, documento US 8.980.824 B2 (2015).

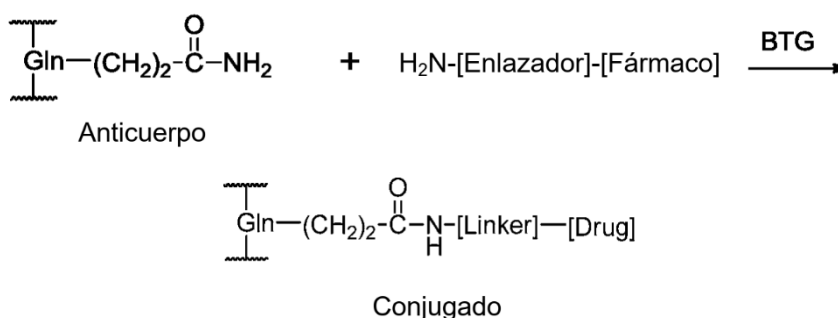
- 40 En una disposición inversa, un anticuerpo Z se puede modificar con 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") o su variante sulfonada sulfo-SMCC, ambos disponibles en Sigma-Aldrich, para introducir un grupo maleimida en el mismo. A continuación, la conjugación se puede efectuar con un compuesto de fármaco-enlazador que tiene un grupo $-SH$ en el enlazador.

Un método de conjugación alternativo emplea la "química de clic" sin cobre, en la que se añade un grupo azida a través de un ciclooctino deformado para formar un anillo de 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 2004, 126, 15046; Best, Biochemistry 2009, 48, 6571. La azida se puede ubicar en el anticuerpo y la ciclooctina en el resto de fármaco-enlazador, o viceversa. Un grupo ciclooctino preferido es dibenzociclooctina (DIBO). Diversos reactivos que tienen un grupo DIBO están disponibles en Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón. La siguiente reacción ilustra la conjugación de química de clic para el caso en el que el grupo DIBO está unido al anticuerpo (Ab):



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

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



El posicionamiento de un residuo de glutamina en una cadena polipeptídica tiene un gran efecto sobre su susceptibilidad a la transamidación mediada por BTG. Ninguno de los residuos de glutamina en un anticuerpo son normalmente sustratos de BTG. Sin embargo, si el anticuerpo está desglucosilado, el sitio de glucosilación es la asparagina 297 (N297; numeración según el índice EU como se expone en Kabat *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest, 5ª ed., Pub. N.º 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991; en lo sucesivo en el presente documento, "Kabat") de la cadena pesada; la glutamina cercana 295 (Q295) se vuelve susceptible a BTG. Un anticuerpo puede desglucosilarse enzimáticamente mediante tratamiento con PNGasa F (Péptido-N-Glucosidasa F). Como alternativa, se puede sintetizar un anticuerpo libre de glucósidos introduciendo una mutación N297A en la región constante, para eliminar el sitio de glucosilación N297. Además, se ha demostrado que una sustitución N297Q no solo elimina la glucosilación, sino que también introduce un segundo residuo de glutamina (en la posición 297) que también es un aceptor de amina. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo que está conjugado con un fármaco de la presente invención se desglucosila. En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución N297Q. Los expertos en la técnica apreciarán que la desglucosilación por modificación post-síntesis o introduciendo una mutación N297A genera dos residuos de glutamina reactivos a BTG por anticuerpo (uno por cadena

pesada, en la posición 295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro residuos de glutamina reactivos a BTG (dos por cadena pesada, en las posiciones 295 y 297).

Un anticuerpo también puede volverse susceptible a la conjugación mediada por BTG introduciendo en él un péptido, o "etiqueta", que contiene glutamina, como se muestra, por ejemplo, en Pons *et al.*, documento US 2013/0230543 A1 (2013) y Rao-Naik *et al.*, Solicitud PCT N.º PCT/US2016/020192, presentada el 1 de marzo de 2016.

En un enfoque complementario, la especificidad del sustrato de BTG se puede alterar variando su secuencia de aminoácidos, de modo que sea capaz de reaccionar con glutamina 295 en un anticuerpo no modificado, como se muestra en Rao-Naik *et al.*, Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/236274, presentada el 2 de octubre de 2015.

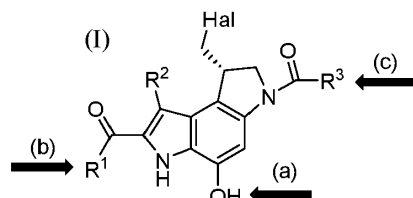
Por último, aunque la transglutaminasa bacteriana más comúnmente disponible es la de *S. mobaraensis*, se puede considerar la transglutaminasa de otras bacterias, que tienen especificidades de sustrato algo diferentes, tal como la transglutaminasa de *Streptovorticillium ladakanum* (Hu *et al.*, documento US 2009/0318349 A1 (2009), documento US 2010/0099610 A1 (2010) y documento US 2010/0087371 A1 (2010)).

La conjugación también se puede realizar usando la enzima Sortasa A, como se muestra en Levary *et al.*, PLoS One 2011, 6(4), e18342; Proft, Biotechnol. Lett. 2010, 32, 1-10; Ploegh *et al.*, documento WO 2010/087994 A2 (2010); y Mao *et al.*, documento WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de Sortasa A (normalmente LPXTG, en el que X es cualquier aminoácido natural) puede estar ubicado en el ligando Z y el motivo aceptor nucleófilo (normalmente GGG) puede ser el grupo R³¹ en la fórmula (III) o viceversa.

Compuestos de seco-CPI-Enlazador

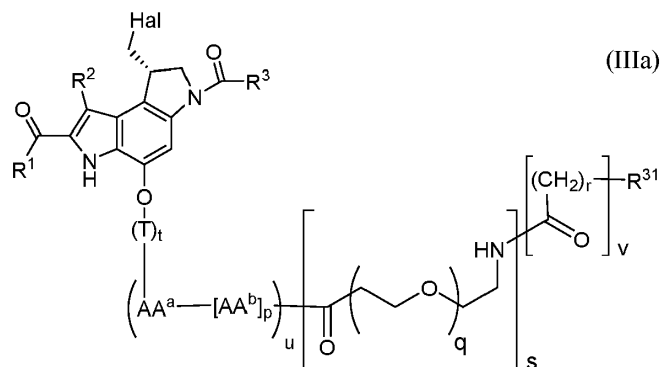
Un ADC de un compuesto de seco-CPI de la presente invención incluye un enlazador unido a un grupo funcional en el compuesto de seco-CPI, cuyo enlazador está unido al anticuerpo. Como reflejo de la diversidad de técnicas de conjugación conocidas en la materia, los compuestos de seco-CPI de la presente invención pueden elaborarse en muchos compuestos de seco-CPI-compuestos de enlazador diferentes adecuados para la conjugación con un anticuerpo.

Generalmente, hay tres sitios diferentes para la unión de un enlazador a un compuesto de seco-CPI de la presente invención, como se ilustra a continuación:



En los compuestos de seco-CPI-enlazador de tipo (a), el enlazador se une al hidroxilo fenólico de la subunidad de unión y, mientras está unido, actúa como un grupo de profármaco que evita la ciclación de la estructura de CPI. En los compuestos de seco-CPI-enlazador de tipo (b), el enlazador se une a través de una funcionalidad adecuada en el grupo R¹, tal como un grupo amino, carboxi o hidroxilo. En los compuestos de seco-CPI-enlazador de tipo (c), el enlazador se une a través de una funcionalidad adecuada en el grupo R³, tal como un grupo amino, carboxi o hidroxilo. En los tipos (b) y (c), el grupo hidroxilo fenólico puede opcionalmente ser un profármaco, como se ha analizado anteriormente.

En una realización, los compuestos de seco-CPI-enlazador de tipo (a) se pueden representar mediante la fórmula (IIIa):



en la que

T es un grupo de autoinmolación;

t es 0 o 1;

AA^a y cada uno de AA^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

u es 0 o 1;

p es 1, 2, 3 o 4;

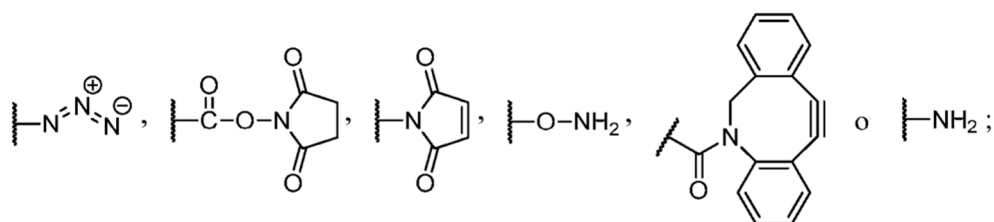
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);

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

s es 0 o 1;

v es 0 o 1;

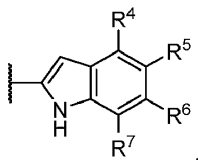
R³¹ es H,



con la condición de que R³¹ pueda ser H solamente si s es 1 y v es 0 y que v pueda ser 0 solo si s es 1 y R³¹ es H;

y R¹, R² y R³ son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

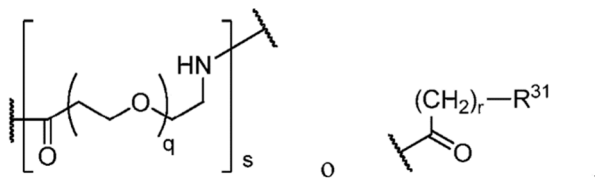
En una realización de enlazadores *seco-CPI* de acuerdo con la fórmula (IIIa), R³ es



especialmente en la que R⁴, R⁶ y R⁷ son cada uno H.

En una realización, u es 1 en la fórmula (IIIa).

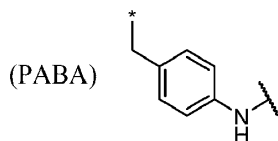
El resto -AA^a-[AA^b]_p- representa un polipéptido cuya longitud se determina por el valor de p (dipéptido si p es 1, tetrapéptido si p es 3, etc.). AA^a está en el extremo carboxi del polipéptido y su grupo carboxilo forma un enlace peptídico (amida) con un nitrógeno de amina del compuesto de *seco-CPI*. Por el contrario, el último AA^b está en el extremo amino del polipéptido y su grupo α-amino forma un enlace peptídico con



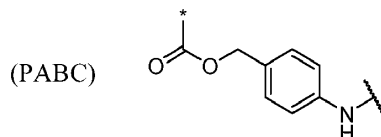
dependiendo de si s es 1 o 0, respectivamente. Los polipéptidos preferidos -AA^a-[AA^b]_p- son Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit, escrito en la dirección N a C convencional, como en H₂N-Val-Cit-CO₂H). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys o Val-Ala. Preferentemente, un polipéptido -AA^a-[AA^b]_p- se puede escindir mediante una enzima que se encuentra dentro de la célula diana (cancerosa), por ejemplo, una catepsina y especialmente catepsina B.

Como se indica por el subíndice, t es igual a 0 o 1, un grupo de autoinmolación T está opcionalmente presente. Un grupo de autoinmolación T preferido es un grupo de alcohol p-aminobencílico (PABA), que tiene la estructura que se muestra a continuación (no se muestra el oxígeno fenólico), representando un asterisco (*) el extremo unido al oxígeno fenólico del compuesto de *seco-CPI* y representando una línea ondulada (~~~~~) el extremo unido al polipéptido -AA^a-

[AA^b]_p-.

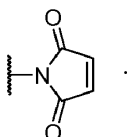


- 5 Otro grupo de autoinmolación T preferido es un grupo *p*-aminobenciloxycarbonilo (PABC), que tiene la estructura que se muestra a continuación:



- 10 En algunos casos, puede ser preferible un grupo PABA sobre un grupo PABC, ya que es más estable hidrolíticamente.

En una realización preferida, el grupo R³¹ es

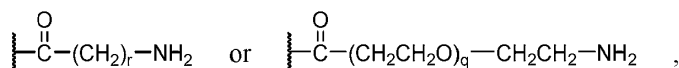


15

En otra realización preferida, el grupo R³¹ es

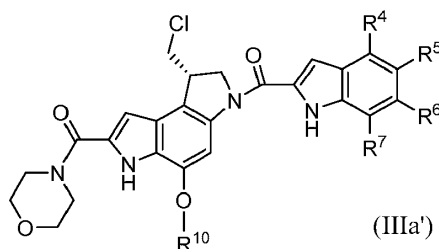


- 20 o R³¹ es H mientras que v es 0 y s es 1. En cada caso, el resultado es un compuesto de *seco*-CPI-enlazador que tiene un grupo amino-terminal, de la estructura



- 25 respectivamente, que es adecuado como donante de amina para una conjugación mediada por transglutaminasa.

Los compuestos de *seco*-CPI-enlazador de tipo (a) preferidos son de acuerdo con la fórmula (IIIa')



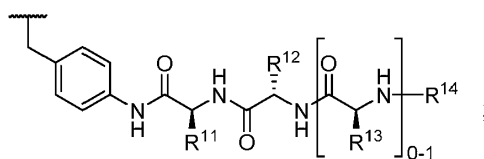
30

en la que

R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ son como se definen con respecto a la fórmula (I) en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento;

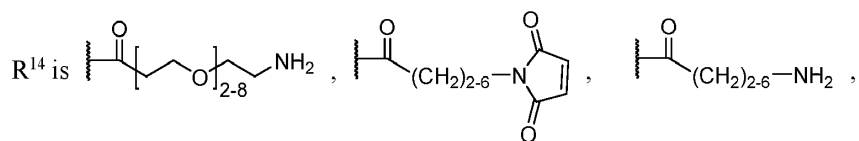
R¹⁰ es

35



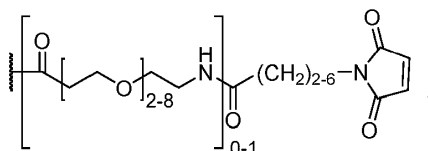
R¹¹, R¹² y R¹³ son independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂CO₂H, CH₂CH₂CO₂H, CH₂C(=O)NH₂, CH₂CH₂C(=O)NH₂, (CH₂)₄NH₂, (CH₂)₃NHC(=NH)NH₂ o (CH₂)₃NHC(=O)NH₂ (es decir, R¹¹, R¹² y R¹³ corresponden

a los residuos de cadena lateral de los aminoácidos glicina, valina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, lisina, arginina y citrulina); y

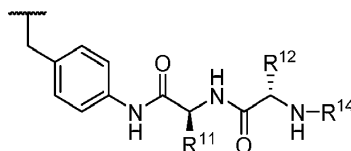


5

o



- 10 Preferentemente, el péptido en R^{10} es un dipéptido, es decir, el sufijo asociado con el aminoácido $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{R}^{13})\text{NH}_2$ en el péptido es cero, correspondiente la fórmula



- 15 Los compuestos específicos de acuerdo con la fórmula (**IIIa'**) se muestran en la Tabla III, en la que R^4 , R^6 y R^7 son H, a menos que se indique de otro modo, y R^{10} es A o B:

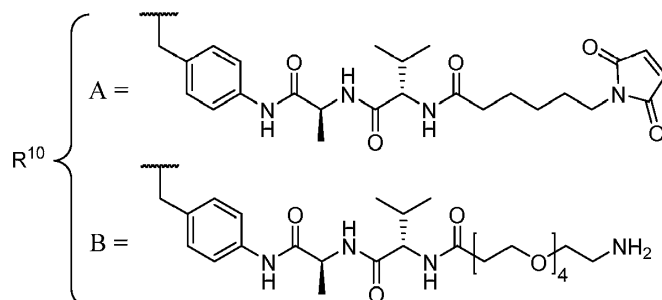
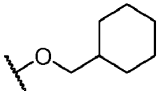

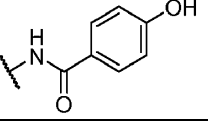

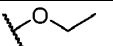
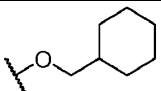


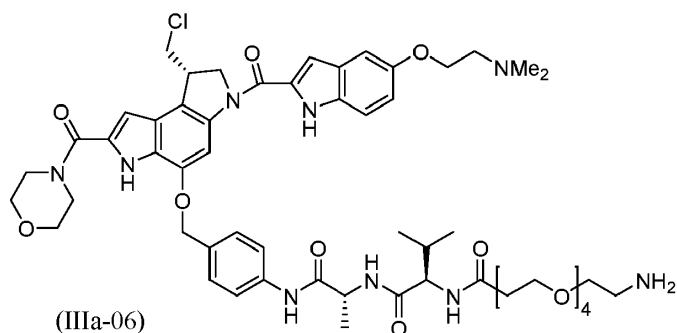
Tabla III - Compuestos de <i>seco</i> -CPI-enlazador		
<i>seco</i> -CPI-enlazador	R^{10}	R^5
IIIa-01	A	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$
<i>seco</i> -CPI-enlazador	R^{10}	R^5
IIIa-02	A	$\text{---} \text{NH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$
IIIa-03	A	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$
IIIa-04	A	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
IIIa-05	B	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$
IIIa-06	B	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$
IIIa-07	B	$\text{---} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

20

(continuación)

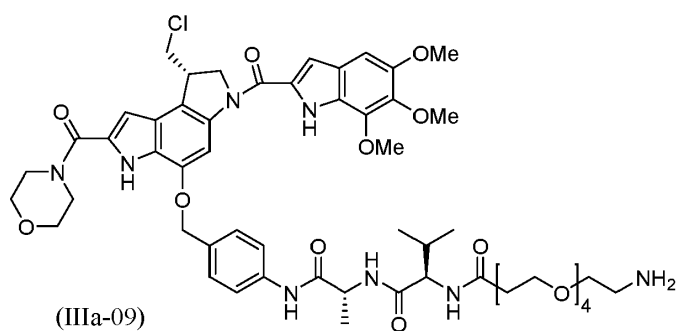
Tabla III - Compuestos de seco-CPI-enlazador		
IIIa-08	B	
IIIa-09	B	 (R ⁴ = H, R ⁶ = R ⁷ = OMe)
IIIa-10	B	
IIIa-11	B	
IIIa-12	B	
IIIa-13	A	

Un compuesto de seco-CPI-enlazador preferido es (IIIa-06), cuya estructura completa se muestra a continuación:



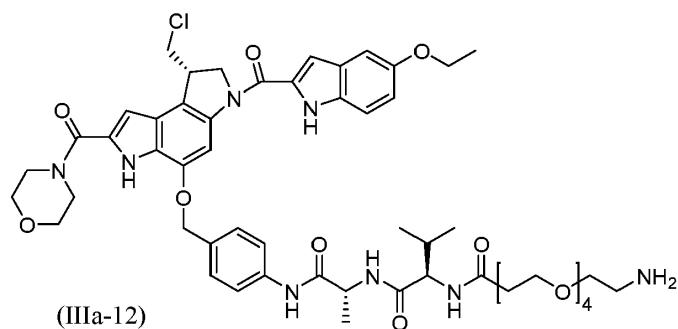
5

Un compuesto de seco-CPI-enlazador preferido es (IIIa-09), cuya estructura completa se muestra a continuación:



10

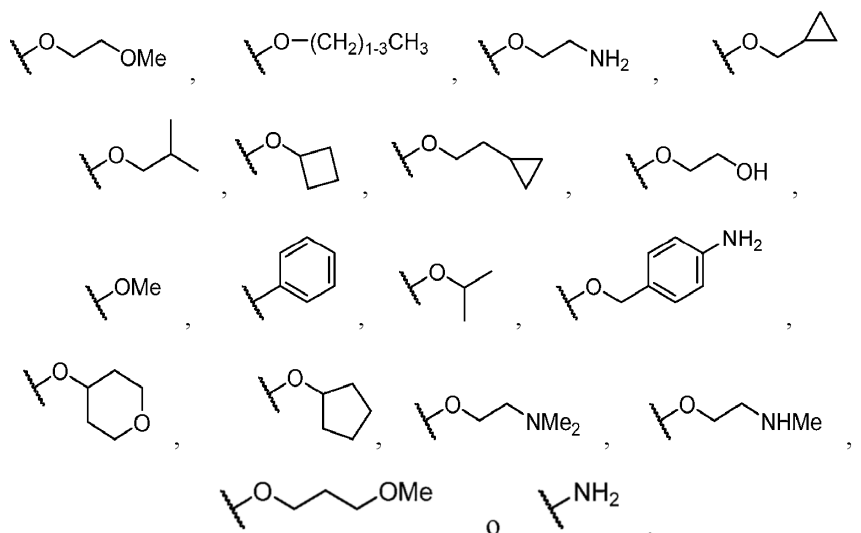
Un compuesto de seco-CPI-enlazador preferido es (IIIa-12), cuya estructura completa se muestra a continuación:



Los compuestos de *seco*-CPI-enlazador que tienen un enlazador de tipo A están diseñados para su conjugación a través de una reacción de adición de Michael con un grupo tiol en el anticuerpo, como se ha analizado anteriormente.

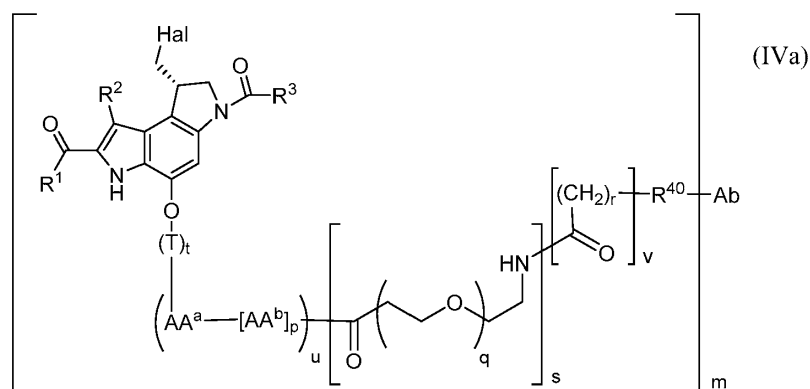
5 Los que tienen un enlazador de tipo B están diseñados para la conjugación mediada por transglutaminasa, de nuevo como se ha analizado anteriormente.

Más preferentemente, en la fórmula (IIIa'), R^4 , R^6 y R^7 son cada uno H; y R^5 es

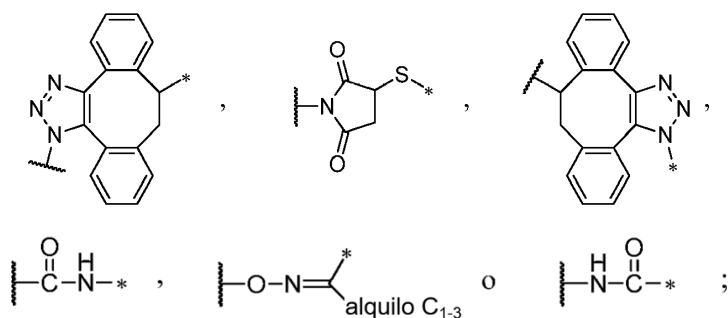


20 Conjugados

En una realización, los conjugados de la presente invención se obtienen a partir de compuestos de *seco*-CPI-enlazador de tipo (a) y pueden representarse por la fórmula (IVa):



en la que
Ab es un anticuerpo;
 R^{40} es un enlace,



en el que la valencia abierta de R^{40} que está unido al Ab se representa por un asterisco (*) y la valencia abierta de R^{40} que está unido a $(CH_2)_r$ se representa por una línea ondulada (~~~~~);

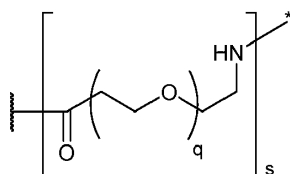
m es 1, 2, 3 o 4;

v es 0 o 1, con la condición de que v pueda ser 0 solo si s es 1 y R^{40} es un enlace y de que R^{40} pueda ser un enlace solo si v es 0 y s es 1;

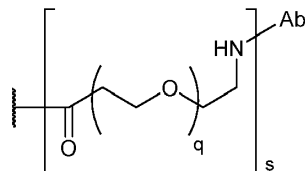
T, t, AA^a , AA^b , u, p, q, s, r y X^A son como se definen con respecto a la fórmula (IIIa); y

R^1 , R^2 y R^3 son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

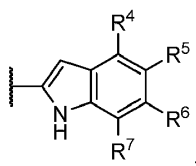
Cuando R^{40} es un enlace, el nitrógeno en



está unido directamente al anticuerpo Ab, según la fórmula a continuación:



En una realización de conjugados de acuerdo con la fórmula (IVa), R^3 es



especialmente cuando R^4 , R^6 y R^7 son cada uno H.

En una realización preferida, u es 1 en la fórmula (IVa).

En la fórmula (IVa), si los subíndices t y u son ambos 0, entonces el enlazador es del tipo no escindible y depende de la degradación del anticuerpo Ab para liberar el fármaco. El componente de polietilenglicol opcionalmente puede estar presente (es decir, s es 1) si su presencia es beneficiosa, por ejemplo, aumentando la solubilidad del compuesto de fármaco-enlazador durante la conjugación y no interfiere con la actividad biológica del fármaco.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dispersiones o soluciones acuosas estériles. También se pueden formular en una microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para lograr una alta concentración de fármaco. Las composiciones también se pueden proporcionar en forma de liofilatos, para reconstituir en agua antes de la administración.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma farmacéutica variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y el modo particular de administración y generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento del principio activo, preferentemente, de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, aún más preferentemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de principio activo junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

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

La dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg o, como alternativa, de 0,1 a 5 mg/kg. Los regímenes de tratamiento de ejemplo son la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal a través de administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosis, después cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención da como resultado preferentemente una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debidos a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos portadores de tumores, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 %, y todavía más preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto, que normalmente es un ser humano pero puede ser otro mamífero.

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

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

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

USOS

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

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

Ejemplos

La práctica de la presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1 - Conjugación mediante adición de Michael

Este procedimiento general se basa en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo por reacción de grupos ϵ -amino de lisina con 2-iminotiolano, seguido de una reacción con un resto de fármaco-enlazador que contiene maleimida, tal como se ha descrito anteriormente. Inicialmente, el anticuerpo se intercambia de tampón a tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 2 mM y se concentra a

5-10 mg/ml. La tiolación se logra mediante la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano a añadir se puede determinar mediante un experimento preliminar y varía de un anticuerpo a otro. En el experimento preliminar, al anticuerpo se le añade una titulación de cantidades crecientes de 2-iminotiolano y, después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente ("TA", aproximadamente 25 °C), el anticuerpo se desala en HEPES 50 mM, glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5 usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos tiol introducidos se determina rápidamente por reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de los grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, que puede controlarse espectroscópicamente a 324 nm. Normalmente se usan muestras con una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm se puede usar para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras y, a continuación, se incuba una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 min a TA. También se incuban al mismo tiempo las muestras blanco de tampón solo más DTDP. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol usando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19.800 M⁻¹.

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

Después de verificar la cantidad de tioles introducidos, se añade el resto de seco-CPI-enlazador en un exceso molar de 2,5 veces por tiol. Se deja proceder la reacción de conjugación en tampón de conjugación que contiene una concentración final del 25 % de propilenglicol y el 5 % de trehalosa. Comúnmente, la solución madre de fármaco-enlazador se disuelve en DMSO al 100 %. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incuba a TA durante 2 h con agitación suave. A continuación, se añade a la mezcla de conjugación un exceso molar de 10 veces de N-etil maleimida (solución madre 100 mM en DMSO) y se agita durante una hora más para bloquear los tioles que no hayan reaccionado. A continuación, la muestra se filtra a través de un filtro de 0,2 µ. El material se cambia de tampón a través de la membrana PES TFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO en 10 mg/ml de glicina, 20 mg/ml de sorbitol, acetonitrilo al 15 % ("ACN") a pH 5,0 (volumen de intercambio de tampón de TFF 5X), para eliminar cualquier fármaco que no haya reaccionado. La formulación final se realiza mediante TFF en 20 mg/ml de sorbitol, 10 mg/ml de glicina, pH 5,0.

Ejemplo 2 - Conjugación mediada por transglutaminasa

El siguiente procedimiento se puede usar para la conjugación mediada por transglutaminasa de compuestos de seco-CPI-enlazador en los que el enlazador tiene un grupo amina que puede actuar como un donante de amina. El anticuerpo puede ser uno que tenga una glutamina reactiva a transglutaminasa, por ejemplo uno con una sustitución N297A o N297Q. La conjugación se realiza mediante transglutaminasa bacteriana recombinante con una relación molar de anticuerpo: enzima de 5:1. La conjugación se realiza usando protocolos estándar en tampón Tris 50 mM, pH 8,0, incubado durante una noche a 37 °C. El conjugado resultante se purifica en una columna de Proteína A, preequilibrada con Tris 50 mM, pH 8,0. El conjugado se eluye con tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones eluidas se neutralizan con Tris 1 M a pH 9,0. El conjugado se puede formular en 20 mg/ml de sorbitol, 10 mg/ml de glicina, pH 5,0.

Los expertos en la materia entenderán que las condiciones y metodologías en estos dos ejemplos son ilustrativas y no limitantes y que las variaciones de los mismos u otros enfoques para la conjugación se conocen en la técnica y pueden usarse en la presente invención.

Ejemplo 3 - Propiedades de los compuestos seco-CPI

La Tabla IV muestra las propiedades de los compuestos de la presente invención, incluyendo la eficacia de inhibición de la proliferación contra diversas líneas celulares de cáncer humano y CLogP. La inhibición de la proliferación se midió usando un ensayo de luminiscencia de ATP de 72 horas (Cheng *et al.*, documento US 8.394.922 B2 (2013)).

Se midió la inhibición de la proliferación frente a: (a) H226 (línea de células cancerosas de mesotelioma humano (pulmón)); (b) N87 (línea de células de cáncer gástrico humano (estómago)); (c) OVCAR3 (línea de células de cáncer de ovario humano); (d) HCT116 (línea de células de cáncer de colon humano); y (e) HCT116/VM46 (sublínea de HCT116 resistente a múltiples fármacos y paclitaxel).

Tabla IV - Propiedades de los compuestos seco-CPI						
Comp. N.º	Inhibición de la proliferación de células cancerosas (línea celular y CE ₅₀ , nM)					CLogP
	H226	N87	OVCAR3	HCT116	HCT116/VM46	
Ia-01	0,014	0,007	-	-	-	1,81
Ia-02	0,042	0,097	0,048	0,045	0,045	2,45

(continuación)

Tabla IV - Propiedades de los compuestos <i>seco-CPI</i>						
Comp. N.º	Inhibición de la proliferación de células cancerosas (línea celular y CE ₅₀ , nM)					CLogP
	H226	N87	OVCAR3	HCT116	HCT116/VM46	
la-03	0,038	0,048	0,026	0,034	0,034	2,97
la-04	0,11	0,15	0,11	0,12	0,12	2,89
la-05	0,18	0,21	0,076	0,17	0,17	3,37
la-06	0,47	0,56	0,32	0,36	0,36	2,83
la-07	0,72	0,81	0,41	0,67	0,67	3,41
la-08	3,4	1,3	2,1	-	-	1,04
la-09	0,055	0,016	0,025	-	-	2,19
la-10	0,25	0,15	-	-	-	4,57
la-11	1,0	1,2	0,52	0,58	0,92	1,92
la-12	0,53	1,3	0,54	0,40	0,29	3,68
la-13	0,32	0,48	0,12	0,18	0,24	2,75
la-14	0,43	0,36	0,10	0,26	0,77	1,55
la-15	0,28	0,32	0,21	0,22	0,26	3,39
la-16	0,40	0,50	-	-	-	2,01
la-17	1,6	36	18	19	25	1,42
la-18	32	48	12	25	19	1,12
la-19	4,2	3,1	1,1	3,2	3,5	0,78
la-20	6,5	3,5	1,5	1,9	2,6	2,36
la-21	0,99	2,2	1,2	0,85	0,50	1,81
la-22	5,1	1,9	1,1	1,2	1,2	1,65
la-23	7,5	2,6	1,1	0,9	1,9	2,42
la-24	250	-	250	250	250	1,60
la-25	23	38	22	13	24	0,78
la-26	9,5	-	2,7	4,1	12	1,34
la-27	1,4	3,5	-	-	-	3,37
la-28	0,30	0,066	0,058	0,079	0,090	2,85
la-29	0,63	0,26	-	-	-	2,60
la-30	0,018	0,045	0,032	0,033	0,097	1,11
la-31	0,24	0,43	0,53	0,62	0,86	3,90
lb-01	2,39	3,6	2,8	3,2	3,5	1,92
lb-02	1,0	0,96	0,53	0,64	1,9	1,83
lc-01	0,91	1,5	0,89	0,43	0,75	1,93
ld-01	-	2,3	1,1	0,93	-	2,18
ld-02	1,2	1,4	-	-	-	1,60

Ejemplo 4 - Compuesto 10

- 5 Este ejemplo y la **figura 1A** se refieren a la síntesis del compuesto **10**.

Se añadió una solución de alcohol 3,5-dinitrobencílico **1** (5 g, 25,2 mmol) en EtOAc (160 ml) a ácido 2-yodoxibenzoico ("SIBX", disponible en Sigma-Aldrich, 17,67 g, 63,1 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 90 °C durante 20 h, se enfrió a TA y se filtró. El sólido se descartó y el filtrado se concentró al vacío para producir el producto en bruto **2** en forma de un sólido de color amarillo, que se disolvió en 100 ml de EtOAc y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ y a continuación agua. A continuación, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La solución se concentró al vacío para proporcionar 4,2 g (81 %) de 3,5-dinitrobenzaldehído **2** en forma de un sólido de color amarillo. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10,24 (s, 1H), 9,08-9,06 (m, 1H), 9,04 (d, J = 2,0 Hz, 2H); Anál. calc. para C₇H₄N₂O₅: 196,01; observado 194,99 [M-H]⁺.

Una solución agitada de *syn*-benzalaldehído oxima (6,18 g, 51,0 mmol) en *N,N*-dimetil-formamida ("DMF", 50 ml) se trató con K₂CO₃ (14,38 g, 102 mmol) y se agitó durante 10 min. Se añadió una solución de 3,5-dinitrobenzalaldehído **2** (5 g, 25,5 mmol) en DMF (50 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 90 °C y se enfrió a TA. A la mezcla de reacción se le añadió (bromometil)benceno (7,12 ml, 58,6 mmol), que a continuación se agitó durante 18 h. La mezcla de reacción se diluyó con Et₂O (200 ml). Se añadió lentamente HCl acuoso (1 N, 100 ml) con agitación. La capa de éter se recogió y la capa acuosa se extrajo con Et₂O (80 ml x 2) y EtOAc (80 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaHCO₃ y a continuación salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para producir 16 g de un aceite de color pardo que se purificó en una columna de 330 g de Biotage (diclorometano del 45 al 55 %/hexano) para proporcionar 3,41 g (52,1 %) de 3-(benciloxi)-5-nitrobenzalaldehído **3** en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 10,07 (s, 1H), 8,37 - 8,29 (m, 1H), 8,10 (t, J = 2,2 Hz, 1H), 7,82 (dd, J = 2,4, 1,2 Hz, 1H), 7,53 - 7,36 (m, 5H), 5,24 (s, 2H); Anál. calc. para C₁₄H₁₁N₁O₄: 257,0; observado 279,3 [M+Na]⁺.

Se añadió gota a gota metanolato de sodio (25 %) (1,313 ml, 5,91 mmol) a una solución agitada de 3-(benciloxi)-5-nitrobenzaldehído **3** (400 mg, 1,555 mmol) y 2-azido-acetato de metilo **4** (disponible en Sigma-Aldrich, 591 mg, 5,13 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano ("THF", 3 ml) y MeOH (3 ml) a -25 °C durante 20 min. La mezcla de reacción se agitó durante 64 h a -20 °C y a continuación a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de hielo y agua, se extrajo con diclorometano ("DCM", 15 ml x 3), se lavó con agua y a continuación con salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ para producir un producto en bruto que se purificó en una columna de 330 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 9 %/Hex.) para proporcionar 323 mg (58,6 %) del compuesto **5**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 8,22 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,80 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,53 - 7,33 (m, 5H), 6,86 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,96 (s, 3H); ¹³C RMN (126 MHz, cloroformo-d) δ 163,4, 159,1, 149,2, 135,6, 135,3, 128,8, 128,5, 128,2, 127,6, 122,8, 122,0, 118,0, 109,8, 70,9, 53,3; Anál. calc. para C₁₇H₁₄N₄O₅: 354,09; observado 377,30 [M+Na]⁺.

Se añadió el compuesto **5** (313 mg, 0,883 mmol) a xileno (80 ml) y se sometió a sonicación durante 5 min. Se formó una solución homogénea, que se desgasificó dos veces. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 20 h a 160 °C y se enfrió a TA. El xileno se evaporó al vacío para producir un sólido de color amarillo que se purificó en una columna de 24 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 15 %/Hexano) para proporcionar 47,3 mg (16,41 %) del compuesto **6a** y 160,3 mg (55,6 %) del compuesto **6b**.

Compuesto **6a**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 10,19 (s a, 1H), 8,06 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,52 - 7,47 (m, 2H), 7,44 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,41 - 7,35 (m, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,01 (s, 3H); ¹³C RMN (126 MHz, cloroformo-d) δ 161,2, 152,7, 136,2, 133,2, 131,2, 130,5, 128,8, 128,3, 127,6, 125,6, 115,2, 112,0, 108,9, 71,5, 52,4;

Anál. calc. para C₁₇H₁₄N₂O₅: 327,1; observado 327,3 [M+H]⁺.

Compuesto **6b**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 9,38 (s a, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,75 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,57 - 7,51 (m, 2H), 7,51 - 7,42 (m, 3H), 7,38 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 5,32 (s, 2H), 3,99 (s, 3H); ¹³C RMN (126 MHz, cloroformo-d) δ 161,4, 145,2, 143,3, 135,3, 130,9, 129,7, 128,9, 128,8, 128,2, 126,7, 113,2, 111,0, 100,5, 71,1, 52,4; Anál. calc. para C₁₇H₁₄N₂O₅: 327,1; observado 327,3 [M+H]⁺.

A una solución agitada del compuesto **6b** (150 mg, 0,460 mmol) en THF (4 ml) se le añadieron Boc-anhídrido (0,192 ml, 0,827 mmol) y 4-dimetilaminopiridina ("DMAP", 11,23 mg, 0,092 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 18 h a TA. Se añadieron salmuera (5 ml) y EtOAc (5 ml) y la agitación continuó durante 5 min. La capa orgánica se recogió. La capa acuosa se extrajo con 10 ml de EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para producir un sólido de color amarillo que se purificó en una columna de 24 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 40 %/Hexano) para proporcionar 184,2 mg (94 %) del compuesto **7**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 8,29 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,70 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,45 - 7,39 (m, 2H), 7,39 - 7,33 (m, 2H), 5,35 (s, 2H), 3,97 (s, 3H), 1,50 (s, 9H); ¹³C RMN (126 MHz, cloroformo-d) δ 160,4, 149,2, 145,5, 143,5, 135,1, 130,1, 130,0, 128,8, 128,6, 128,1, 126,3, 112,6, 112,4, 102,1, 86,4, 71,2, 52,4, 27,2; Anál. calc. para C₂₂H₂₂N₂O₇: 426,1; observado 449,4 [M+Na]⁺.

Se añadieron polvo de cinc (130 mg, 1,982 mmol) y NH₄Cl (212 mg, 3,96 mmol) a una solución agitada del compuesto **7** (169 mg, 0,396 mmol) en acetona (4 ml)/agua (0,800 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a TA. La mezcla de reacción se concentró al vacío para producir 180 mg del compuesto en bruto **8**, que se disolvió de nuevo en EtOAc (8 ml), se lavó con agua (8 ml) y a continuación con salmuera (8 ml) y se secó sobre MgSO₄. Se concentró al vacío para producir 160 mg del compuesto en bruto **8** (pardo) que se purificó en una columna de 12 g de Biotage (EtOAc del 15 % al 35 %/Hexano) para proporcionar 138,1 mg (88 %) del compuesto **8**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,46 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,35 - 7,30 (m, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,50 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 6,29 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 5,22 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,53 (s a, 2H), 1,49 (s, 9H); Anál. calc. para C₂₂H₂₄N₂O₅: 397,17; observado 397,13 [M+H]⁺.

Se añadió Boc-anhídrido (0,112 ml, 0,484 mmol) a una solución agitada del compuesto **8** (128 mg, 0,323 mmol) en THF (3,5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 20 h a TA y se concentró al vacío para producir 178 mg del compuesto en bruto ceroso de color pardo **9**, que se purificó en una columna de 12 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 15 %/Hexano) para proporcionar 156 mg (97 %) del compuesto **9**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,48 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 7,39 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 7,36 - 7,30 (m, 2H), 7,13 (s, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,41 (s a, 1H), 5,24 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 1,54 (s, 9H), 1,47 (s, 9H). Anál. calc. para C₂₇H₃₂N₂O₇: 496,2; observado 497,5 [M+H]⁺.

Se añadieron N-yodosuccinimida (127 mg, 0,564 mmol) y ácido acético (0,065 ml, 1,128 mmol) a una solución agitada del compuesto **9** (140 mg, 0,282 mmol) en tolueno (8 ml). El matraz de reacción se cubrió con papel de aluminio y se agitó durante 18 h a TA. La mezcla de reacción se vertió en agua (20 ml). Se añadió EtOAc (10 ml) y la mezcla se agitó durante 2 min. La capa orgánica se recogió. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron al vacío para producir una cera de color púrpura oscuro que se purificó en una columna de 12 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 12 %/Hexano) para proporcionar 110,6 mg (63,0 %) del compuesto **10** en forma de una cera de color amarillo: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,81 (s a, 1H), 7,50 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,43 - 7,36 (m, 2H), 7,35 - 7,30 (m, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,79 (s a, 1H), 5,27 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 1,56 (s, 9H), 1,43 (s, 9H); Anál. Calc. para C₂₇H₃₁N₂O₇: 622,1; observado 623,4 [M+H]⁺.

Ejemplo 5 - Éster 12

Este ejemplo y la **figura 3B** se refieren a la preparación del éster **12**.

5 Se añadieron NaH (7,71 mg, 0,193 mmol) y 1,3-dicloropropeno (23,50 µl, 0,241 mmol) a una solución agitada del compuesto **10** (100 mg, 0,161 mmol) en DMF a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se vertió en una solución saturada de NH₄Cl (100 ml) y se extrajo con Et₂O (2 x 80 ml). El extracto se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para producir una cera de color pardo que se purificó en una columna de 12 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 12 %/Hexano) para proporcionar 88,7 mg (79 %) del compuesto **11**: ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,47 - 7,31 (m, 5H), 7,21 (s, 1H), 6,53 (d, J = 18,3 Hz, 1H), 6,03 - 5,83 (m, 3H), 5,34 - 5,21 (m, 2H), 3,96 (s, 2H), 4,57 - 3,70 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,30 (d, J = 9,8 Hz, 9H). Anál. Calc. para C₃₀H₃₄ClIN₂O₇: 696,1; observado 719,5 [M+Na]⁺.

15 Se añadieron hidruro de tri-n-butilestaño (1,793 ml, 6,59 mmol) y 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) ("AIBN", 0,085 g, 0,507 mmol) a una solución agitada del compuesto **11** (3,5305 g, 5,07 mmol) en benceno (100 ml). La mezcla de reacción se desgasificó una vez y se agitó durante 4 h a 80 °C. La mezcla de reacción se enfrió a TA al vacío para producir una cera de color pardo que se purificó en una columna de 120 g de Biotage (EtOAc del 5 % al 10 %/Hexano) para proporcionar una mezcla de 2,7552 g de los compuestos **12** y **12a**. La mezcla se separó por separación quiral SFC: Chiralpak: Columna preparativa AD-H, 30 x 250 mm, 5 µm; Fase móvil: MeOH al 35 % en CO₂ a 130 bar; temperatura: 35 °C; Caudal: 70,0 ml/min durante 13 min; UV controlada a 220 nm. Este procedimiento proporcionó 0,9562 g (33,1 %) del compuesto **12**. ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,52 - 7,30 (m, 6H), 7,11 (s, 1H), 5,27 (s, 2H), 4,20 - 4,13 (m, 1H), 4,01 - 3,82 (m, 6H), 3,53 (t, J = 9,9 Hz, 1H), 1,57 (s, 9H), 1,43 (s a, 9H); Anál. Calc. para: C₃₀H₃₅ClIN₂O₇ 570,2; observado 571,5 [M+H]⁺; [α]_D²⁰ -17,06 (c 2,45, CHCl₃) y 0,9252 g (32,0 %) del compuesto **12b**. ¹H RMN (500 MHz, cloroformo-d) δ 7,53 - 7,30 (m, 6H), 7,11 (s, 1H), 5,27 (s, 2H), 4,22 - 4,13 (m, 1H), 4,12 - 3,83 (m, 6H), 3,53 (t, J = 10,1 Hz, 1H), 1,57 (s, 9H), 1,43 (s a, 9H). Anál. Calc. para C₃₀H₃₅ClIN₂O₇: 570,2; observado 571,5 [M+H]⁺; [α]_D²⁰ +17,06 (c 2,45, CHCl₃).

Ejemplo 6 - Compuesto 16

30 Este ejemplo y la **figura 2** se refieren a la preparación del compuesto **16**.

Se preparó una solución del éster **12** (1 g, 1,751 mmol) en ACN (Aldrich, 40 ml). Se añadió LiOH (0,125 g, 5,22 mmol) en agua destilada (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 6 N a pH 4 y se concentró al vacío para eliminar el ACN. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Las fases orgánicas se lavaron con agua y salmuera, se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se concentraron y se secaron a alto vacío durante una noche para producir el ácido en bruto **13** (0,98 g). ESI-LCMS (M+H): 557,0.

40 Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA", Aldrich, 0,612 ml, 3,50 mmol) a una solución de ácido **13** (0,98 g), morfolina **13a** (Aldrich, 0,458 g, 5,25 mmol) y hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio ("HATU", N.º de reg. CAS 148893-10-1, Oakwood Chemical, 0,999 g, 2,63 mmol) en DMF anhidra (Acros, 5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 45 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se trató con EtOAc, agua y salmuera. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron con 2 g de gel de sílice para dar una suspensión. La suspensión se purificó en una columna de 24 g COMBIFLASH™, eluyendo con EtOAc al 0-35 % en gradiente de hexano. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **14** en forma de un sólido (0,872 g, 80 % de rendimiento en dos etapas). ESI-LCMS (M+H): 626,1.

50 Se preparó una solución del compuesto **14** (396 mg, 0,633 mmol) en THF anhidro (Acros, 5 ml). Se añadió formiato de amonio (Aldrich, 1,104 g, 8,76 mmol) en agua destilada (1 ml). Se burbujeó gas nitrógeno a través de la mezcla de reacción durante 5 min y a continuación se añadió Pd sobre carbono (Aldrich-Sigma, 10 %, 60 mg). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 0,5 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y se filtró. El filtrado se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para dar un residuo, que se liofilizó con ACN y agua para producir el compuesto **15** (sólido de color blanco, 225 mg, 66 % de rendimiento). ESI-LCMS (M+H): 536,2.

60 Se añadió ácido trifluoroacético ("TFA", Aldrich, 1 ml) a una solución del compuesto **15** (78 mg, 0,146 mmol) en DCM anhidro (Acros, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se liofilizó con ACN y agua para producir el compuesto **16** en forma de un sólido de color verde (81 mg, sal TFA doble, 98 %). ESI-LCMS (M+H): 336,0.

Ejemplo 7- Compuesto 18

Este ejemplo se refiere a la preparación del compuesto **18**, como se muestra en la **figura 2**.

Se preparó una solución de éster etílico **17a** (Alfa Aesar, 300 mg, 1,46 mmol) y trifetilfosfina ("TEPP", Aldrich-Sigma,

767 mg, 2,92 mmol) en THF anhidro (Acros Organics, 10 ml). Se añadió gota a gota azodicarboxilato de di-*tert*-butilo ("DBAD", Aldrich, 673 mg, 2,92 mmol) en THF anhidro (Acros, anhidro, 2 ml) durante 10 min, seguido de 2-metoxietanol **17b** (Aldrich, 445 mg, 5,85 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El análisis por LCMS mostró que la reacción casi se había completado. La mezcla de reacción se trató con EtOAc, agua y salmuera. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron con gel de sílice (1 g) al vacío para producir una suspensión. La suspensión se purificó en una columna de 24 g COMBIFLASH™, eluyendo con EtOAc al 0-30 % en gradiente de hexano. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **17** en forma de un sólido (314 mg, 1,19 mmol, 82 %). ESI-LCMS (M+H): 264,1.

Se añadió LiOH (Aldrich, 50 mg) en agua destilada (1 ml) a una solución del compuesto **17** (314 mg, 1,19 mmol) en ACN (Acros, 10 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 3 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético (0,5 ml) y se concentró al vacío para dar 2 ml. La mezcla resultante se cargó en una columna de 50 g COMBIFLASH™ AQ Gold y se eluyó con ACN al 0-60 % en gradiente de agua (ambos con ácido fórmico al 0,05 %, 50 ml/min). Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **18** en forma de un polvo de color blanco (226 g, 0,961 mmol, 81 %). ESI-LCMS (M+H): 236,0.

Ejemplo 8 - Compuesto de seco-CPI Ia-01

Este ejemplo y la **figura 2** se refieren a la preparación del compuesto de seco-CPI **Ia-01**.

Se preparó una solución de los compuestos **16** (5 mg, 0,015 mmol) y **18** (7,0 mg, 0,030 mmol) en DMF anhidra (Acros, 1 ml). Se añadió clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-AP-etilcarbodiimida ("EDC", Aldrich, 5,71 mg, 0,030 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con ACN al 45-60 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ 5 µm EVO C18 de 150 x 21,2 mm. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir **Ia-01** en forma de un sólido de color blanquecino (4,1 mg, 7,4 µmol, 50 % de rendimiento). ESI-LCMS (M+H): 553,1. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) 11,54 (1H, s), 11,29 (1H, s), 9,75 (1H, s), 7,75 (1H, s), 7,39 (1H, d), 7,15 (1H, d), 7,02 (1H, d), 6,91 (2H, d), 4,74 (1H, t), 4,45 (1H, d), 4,14 (4H, m), 3,89 (2H, m), 3,40-3,80 (12H, m).

Generalmente, siguiendo los procedimientos de este ejemplo y la figura 2, pero usando materiales precursores alternativos, se prepararon compuestos de seco-CPI adicionales como se enumeran en la Tabla V a continuación.

Tabla V - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 2

Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
Ia-02	[M-H] ⁻ = 521,2	Se usó etanol en lugar del compuesto 17b .
Ia-08	[M+H] ⁺ = 541,1	Se usó etano-1,2-diol en lugar del compuesto 17b .
Ia-09	[M+H] ⁺ = 567,1	Se usó 3-metoxi-1-propanol en lugar del compuesto 17b .
Ia-10	[M+H] ⁺ = 591,1	Se usó ciclohexilmetanol en lugar del compuesto 17b .
Ia-16	[M+H] ⁺ = 566,1	Se usó 2-(dimetilamino)etanol en lugar del compuesto 17b .
Ia-30	[M+H] ⁺ = 569	Se usó ácido 5,6,7-trimetoxi-1H-indolo-2-carboxílico (N.º de reg. CAS 128781-0707) en lugar del compuesto 18 .
Ia-31	[M+H] ⁺ = 565,0	Se usó 3-metilbutan-1-ol en lugar del compuesto 17b .

Ejemplo 9 - Compuesto 26

Este ejemplo y la **figura 3A** se refieren a la síntesis del compuesto **26**.

Se preparó una solución del compuesto **19a** (Bachem, 7,5 g, 24,09 mmol) y (4-aminofenil)-metanol **19b** (Aldrich, 3,86 g, 31,3 mmol) en DCM anhidro (Acros, 50 ml) y metanol anhidro (Acros, 50 ml). Se añadió 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina ("EEDQ", Bachem, 8,94 g, 36,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El análisis por LCMS mostró que la reacción casi se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (400 ml) y la solución resultante se lavó con agua y salmuera. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío para dar 100 ml de volumen. El sólido de color blanco precipitado se recogió por filtración y se secó al aire durante un fin de semana para producir el compuesto **20** (sólido de color blanco, 8,9 g, 21,37 mmol, 89 %). ESI-LCMS (M+H): 417,1.

Se añadió piperidina (Aldrich, 1 ml) a una solución del compuesto **20** (2,2 g, 5,28 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 10 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se liofilizó con ACN y agua para producir el compuesto en bruto **21** con parte de residuo de Fmoc en forma de un sólido de color blanco (2,12 g). ESI-LCMS (M+H): 195,0.

Se preparó una solución del compuesto **21** (2,12 g, en bruto) y el compuesto **22a** (Aldrich, 1,610 g, 5,28 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 10 ml). Se añadió DIPEA (Aldrich) para ajustar el pH de la mezcla de reacción por encima de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se trató con EtOAc, agua y salmuera. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron para dar un residuo. El residuo se disolvió de nuevo con ACN (Aldrich, 5 ml) y agua destilada (10 ml). La suspensión se filtró. El filtrado se cargó en una columna de 130 g COMBIFLASH™ AQ Gold y se eluyó a 75 ml/min con ACN al 25-40 % (con ácido fórmico al 0,05 %) y agua (también con ácido fórmico al 0,05 %). Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **22** en forma de un sólido de color blanco (0,89 g, 2,262 mmol, 42,8 %). ESI-LCMS (M+H): 394,1.

Se preparó una solución del compuesto **22** (147 mg, 0,374 mmol) y perbromometano (Aldrich, 217 mg, 0,653 mmol) en DCM anhidro (Acros, 4 ml). Se añadió TPP (Aldrich, 171 mg, 0,653 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min, después de lo cual se había formado una solución transparente. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se cargó en una columna de 12 g COMBIFLASH™ Gold y se eluyó con EtOAc al 50-100 % en hexano (25 ml/min). Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío durante 15 min para producir el compuesto **23** en forma de un sólido (92 mg, 54 %). ESI-LCMS (M+H): 456,1.

Se añadió metil litio en éter dietílico (Aldrich, 1,6 M, 0,233 ml, 0,373 mmol) a una solución del compuesto **15** (FIG. 2, 100 mg, 0,187 mmol) en THF anhidro (Acros, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Se añadió el compuesto **23** (92 mg, 0,202 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 10 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se trató con EtOAc, agua y salmuera. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **24** (153 mg, en bruto). ESI-LCMS (M+H): 911,2.

Se añadió TFA (Aldrich, 2 ml) a una solución del compuesto en bruto **24** (153 mg) en DCM anhidro (Acros, 0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y se purificó en una columna de 30 g COMBIFLASH™ AQ Gold, eluyendo con ACN al 15-30 % (con ácido fórmico al 0,05 %) en agua desionizada (con ácido fórmico al 0,05 %) a 35 ml/min. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **25** en forma de un sólido de color blanco (61 mg, 53,5 %). ESI-LCMS (M+H): 611,2.

Se preparó una solución del compuesto **25** (61 mg, 0,100 mmol) y BOC-anhídrido (Oakwood, 0,030 ml, 0,130 mmol) en DMF anhidra (Acros, 1 ml). Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,060 ml, 0,348 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa con ACN al 30-50 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ C18 EVO 5 µ de 150 x 22,1 mm. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **26** en forma de un sólido de color blanco (60 mg, 84,4 %). ESI-LCMS (M+H): 711,2.

Ejemplo 10 - Compuesto de seco-CPI-enlazador IIIa-03

Este ejemplo y la figura 3B se refieren a la preparación del compuesto IIIa-03.

Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,074 ml, 0,422 mmol) a una solución del compuesto **18** (FIG. 2, 29,8 mg, 0,127 mmol) y HATU (Oakwood, 48,1 mg, 0,127 mmol) en DMF anhidra (Acros, 0,7 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 min. Se añadió el compuesto **26** (figura 3B, 30 mg, 0,042 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado al 70 %. La reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con ACN al 50-65 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ C18 EVO 5 µ 150 x 22,1 mm. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **27** en forma de un polvo (27 mg, 68,8 %). ESI-LCMS (M+H): 928,3.

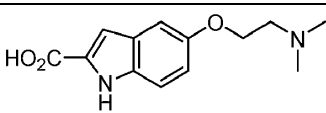
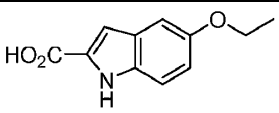
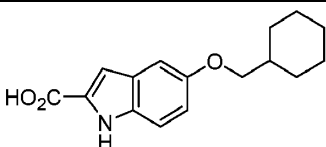
Se añadió TFA (Sigma, 1 ml) a una solución del compuesto **27** (27 mg, 0,029 mmol) en DCM anhidro (Acros, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con ACN al 40-50 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ C18 EVO 5 µ 150 x 22,1 mm. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **28** en forma de un polvo (20 mg, 83,0 %). ESI-LCMS (M+H): 828,2.

Se añadió DIPEA (Sigma, 20 µl, 0,114 mmol) a una solución del compuesto **28** (20 mg, 0,024 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida éster del ácido 6-maleimidohexanoico **29** (disponible en SIGMA-Aldrich, 11,17 mg, 0,036 mmol) en DMF anhidra (Acros, 0,7 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con acetonitrilo al 50-65 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ C18 EVO 5 µ de 150 x 22,1 mm. Las fracciones que se esperaba que contuvieran el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto seco-CPI-enlazador IIIa-03 en forma de un polvo (12,8 mg, 51,9 %). ESI-LCMS (M+H): 1021,5. ¹H RMN (DMSO-d₆):

δ 11,98 (s, 1H), 11,77 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz), 7,79 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 7,42 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 7,29 (d, 3H, $J = 8,3$ Hz), 7,19 (s, 1H), 6,98-7,03 (m, 4H), 6,61 (d, 1H, $J = 7,19$ Hz), 6,53 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 5,05 (t, 2H, $J = 4,7$ Hz), 4,45 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz), 4,34 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz), 4,11-4,17 (m, 3H), 3,52-3,72 (m, 10H), 3,09-3,38 (m, 9H), 2,15 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,48 (m, 4H), 1,27 (m, 3H), 1,17 (m, 2H), 0,84 (m, 6H).

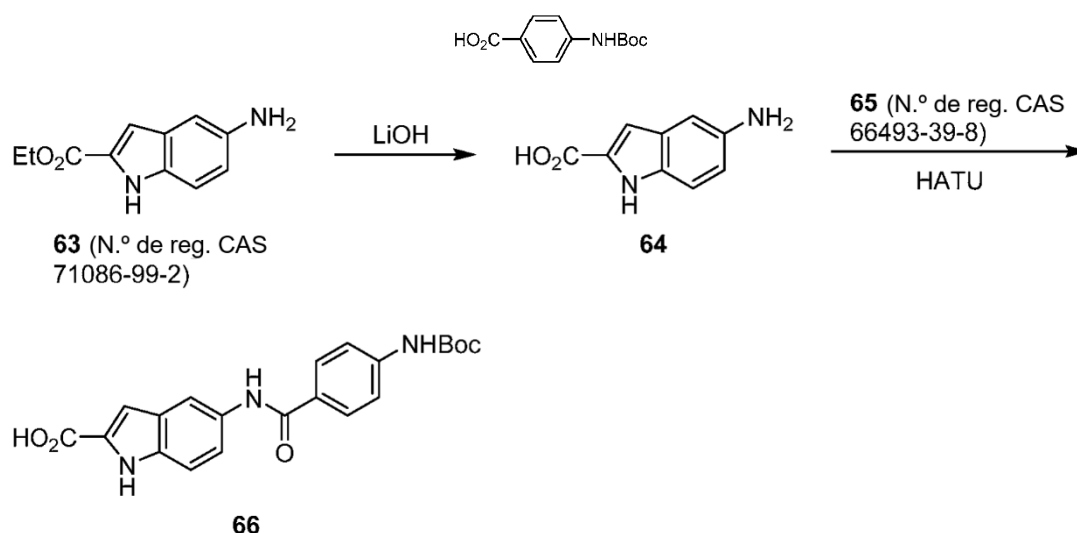
5

Se prepararon compuestos de seco-CPI-enlazador adicionales como se enumeran en la Tabla VI a continuación generalmente siguiendo los procedimientos de este ejemplo y el esquema de las **figuras 3A-3B**, pero usando materiales precursores alternativos.

Tabla VI - Compuestos de seco-CPI-enlazador elaborados siguiendo las figuras 3A-3B		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
IIIa-01	$[M+H]^+ = 1034,4$	 , se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 .
IIIa-02	$[M+H]^+ = 1081,4$	El compuesto 66 , con la eliminación posterior del grupo protector Boc, se usó en lugar del compuesto 18 . A continuación se muestra el esquema para la síntesis del compuesto 66 .
IIIa-04	$[M+H]^+ = 991,4$	 , se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 .
IIIa-13	$[M+H]^+ = 1059,4$	 , se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 .

10

Preparación del compuesto 66



15

Ejemplo 11 - Compuesto de seco-CPI Ia-21

Este ejemplo y la **figura 4** se refieren a la preparación del compuesto de seco-CPI **Ia-21**.

20

Se añadió HCl en dioxano (4 N, 15 ml) al éster **12** (0,25 g, 0,4388 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 5 h. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se secó en una atmósfera de nitrógeno para producir un residuo de color azul oscuro en forma del ácido en bruto **30**, usado en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI-LCMS ($M+H$): 371,1.

25

Se añadió N,N-dimetilacetamida ("DMA", 5 ml) al ácido en bruto **30** (sal clorhidrato, 178 mg, 0,437 mmol), ácido 5-metoxi-1H-indolo-2-carboxílico **30a** (N.º de reg. CAS 4382-54-1, disponible en Sigma-Aldrich, 125 mg, 0,656 mmol), EDC (251 mg, 1,311 mmol), 1-hidroxibenzotriazol ("HOBT", 201 mg, 1,311 mmol) y NaHCO₃ (184 mg, 2,185 mmol). La solución de color negro se agitó a TA durante 4,5 h. El análisis por LCMS mostró la aparición del pico del producto.

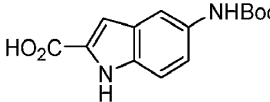
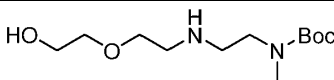
La mezcla de reacción se diluyó con agua (15 ml), se agitó a TA durante 15 min y se filtró. El producto en bruto se recogió en forma de un sólido de color pardo y se disolvió de nuevo en DCM/metanol. La solución resultante se concentró a sequedad con gel de sílice (1,3 g) para formar una suspensión. La suspensión se purificó en una columna de gel de sílice de 15 g con acetato de etilo al 0-3 % en gradiente de eluyente de DCM. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron, se concentraron y se secaron al vacío para producir el producto en bruto (206 mg). El producto en bruto se disolvió de nuevo en metanol al 20 % en cloroformo y se concentró con 1,3 g de gel de sílice para dar una suspensión. La suspensión se purificó sobre una columna de gel de sílice con DCM al 100 % y acetato de etilo al 1-5 % en eluyente de hexano. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto ligeramente impuro **31** (0,108 g, 0,199 mmol, 45,4 %). ESI-LCMS (M+H): 544,4.

Se añadieron THF (3 ml), agua (1,000 ml) y MeOH (2,000 ml) al compuesto **31** (104 mg, 0,191 mmol) y se añadió hidróxido de litio hidrato (138 mg, 3,29 mmol). La mezcla heterogénea de color amarillo se agitó durante una noche. El análisis por LC/MS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se acidificó con HCl 1 N y a continuación se filtró. El sólido se recogió y se secó para producir el compuesto en bruto **32** (0,168 g, 88 %). ESI-LCMS (M+H): 529,9.

Se añadió DMA (0,5 ml) al compuesto **32** (15 mg, 0,028 mmol), N,N'-dimetiletano-1,2-diamina **32a** (N.º de reg. CAS 110-70-3, disponible en Sigma-Aldrich, 1,247 mg, 0,014 mmol), EDC (10,85 mg, 0,057 mmol), HOBT (8,67 mg, 0,057 mmol) y NaHCO₃ (9,51 mg, 0,113 mmol). El análisis por LC/MS mostró que la reacción se había completado al 50 %. La mezcla de reacción se diluyó con MeOH y se purificó por LC preparativa con gradiente de ACN al 15-100 % en agua (ambos con TFA al 0,1 %, 40 ml/min). Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **33** (5,8 mg, 7,98 µmol, 28,2 %). ESI-LCMS (M+H): 600,10.

Se añadió MeOH (0,5 ml) al compuesto **33** (sal TFA, 5,7 mg, 7,98 µmol), formiato de amonio (15,10 mg, 0,239 mmol) y Pd-C (1,699 mg, 1,596 µmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 30 s. Después de 10 min, el análisis por LC/MS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se purificó por HPLC preparativa con ACN al 0-75 % en agua (ambos con TFA al 0,1 %, 25 ml/min) en una columna Waters-YMC-OBOD S5 de 20 x 100 mm. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto de seco-CPI **la-21** en forma de un sólido de color ámbar (1,5 mg, 2,12 µmol, 26,5 %). ESI-LCMS (M+H): 510,15. ¹H RMN (MeOD, 500 MHz) 7,92 (1H, s), 7,41 (1H, d, J = 5 Hz), 7,18 (1H, d, J = 1 Hz), 7,14 (1H, s), 7,07 (1H, s), 6,96 (1H, dd, J = 10 Hz), 4,76 (1H, t), 4,61 (1H, dd), 4,09 (2H, m), 3,86 (3H, s), 3,80 (3H, m), 3,40 (2H, t, J = 5 Hz), 3,03 (6H, s).

Generalmente, siguiendo los procedimientos de este ejemplo y la figura 4, pero usando materiales precursores alternativos, se prepararon compuestos de seco-CPI adicionales como se enumeran en la Tabla VII a continuación.

Tabla VII - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 4		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
la-11	[M+H] ⁺ = 509,3	Se usó morfolina en lugar del compuesto 32a .
la-19	[M+H] ⁺ = 494,1	Se usó morfolina en lugar del compuesto 32a y <div style="text-align: center;">  </div> se usó en lugar del compuesto 30a , con la eliminación posterior del grupo protector Boc.
la-20	[M+H] ⁺ = 522,2	Se usó 1-metilpiperazina en lugar del compuesto 32a .
la-22	[M+H] ⁺ = 527,2	Se usó 2-(2-aminoeto)etanol en lugar del compuesto 32a .
la-23	[M+H] ⁺ = 511,2	Se usó (S)-2-aminobutan-1-ol en lugar del compuesto 32a .
la-24	[M+H] ⁺ = 584,4	<div style="text-align: center;">  </div> Se usó en lugar del compuesto 32a , con la eliminación posterior del grupo protector Boc.

Ejemplo 12 - Compuesto de seco-CPI-enlazador IIIa-05

Este ejemplo y la **figura 5** se refieren a la preparación del compuesto de seco-CPI-enlazador **IIIa-05**.

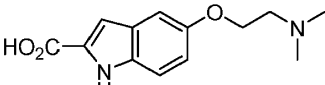
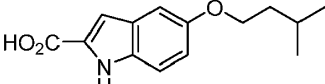
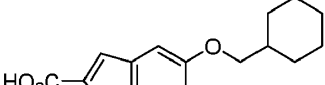
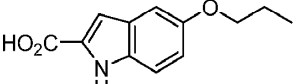
Se añadió DIPEA (Sigma, 0,052 ml, 0,299 mmol) a una solución del compuesto **25** (61 mg, 0,100 mmol) y éster de hidroxisuccinimida **25a** (QuiantaBioscience, 76 mg, 0,130 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 60 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético (40 µl), se cargó en una columna de 30 g COMBIFLASH™ AQ Gold y se purificó con ACN al 50-75 % en agua (ambos con ácido fórmico al 0,05 %, 35 ml/min). Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **34** (52 mg, 0,048 mmol, 48,2 % de rendimiento). ESI-LCMS (M+H): 1080,3.

Se añadió DIPEA (Sigma, 0,042 ml, 0,241 mmol) a una solución del ácido **18** (34,0 mg, 0,144 mmol), el compuesto **34** (52 mg, 0,048 mmol) y HATU (Oakwood, 54,9 mg, 0,144 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 0,7 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado al 70 %. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa con ACN al 45-65 % en agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ 5 µ C18 EVO de 150 x 21,2 mm. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **35** (31 mg, 49,8 %). ESI-LCMS (M+H): 1297,3.

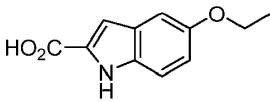
Se añadió piperidina (Aldrich, 50 µl) a una solución del compuesto **35** (31 mg) en DMF (Acros, anhidra, 0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis por LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se neutralizó con AcOH (50 µl) y se purificó por HPLC preparativa con ACN al 30-40 % en gradiente de agua (con TFA al 0,1 %, 20 ml/min) en una columna KINETEX™ C18 5 µ de 150 x 21,2 mm. Las fracciones que contenían el producto esperado se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto de seco-CPI-enlazador **IIla-05** (22 mg, 64,2 %), en forma de una sal TFA. ESI-LCMS (M+H): 1075,6. ¹H RMN (DMSO-d₆): δ 11,97 (s, 1H), 11,77 (s, 1H), 9,81 (s, 1H), 8,15 (d, 1H, J = 3,1 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,79 (s, 3H), 7,42 (d, 1H, J = 9,1 Hz), 7,30 (d, 3H, J = 8,6 Hz), 7,19 (s, 1H), 6,96-7,02 (m, 2H), 6,63 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 6,53 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 5,06 (t, 2H, J = 4,9 Hz), 4,45 (d, 1H, J = 10,7 Hz), 4,34 (d, 1H, J = 7,1 Hz), 4,21 (m, 1H), 4,12 (s, 2H), 2,96-3,72 (m, 32H), 2,36-2,48 (m, 4H), 1,97 (m, 2H), 1,28 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 0,85 (m, 6H).

Se prepararon compuestos de seco-CPI-enlazador adicionales como se enumeran en la Tabla VII a continuación generalmente siguiendo los procedimientos de este ejemplo y el esquema de la **figura 5**, pero usando materiales precursores alternativos.

Tabla VIII - Compuestos de seco-CPI-enlazador elaborados siguiendo la figura 5

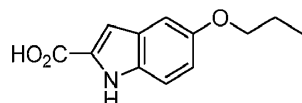
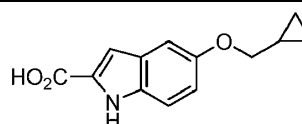
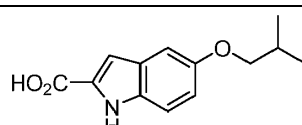
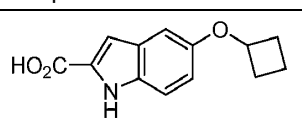
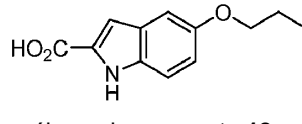
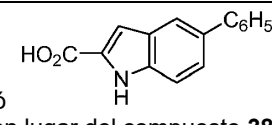
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
IIla-06	[M+H] ⁺ = 1088,4	 <p>, se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2.</p>
IIla-07	[M+H] ⁺ = 1087,3	 <p>, se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2.</p>
IIla-08	[M+H] ⁺ = 1113,4	 <p>, se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2.</p>
IIla-09	[M+H] ⁺ = 1091,3	Se usó ácido 5,6,7-trimetoxi-1 <i>H</i> -indolo-2-carboxílico (N.º de reg. CAS 128781-0707) en lugar del compuesto 18 .
IIla-10	[M+H] ⁺ = 1134,5	Se usó el compuesto 48a (figura 9) en lugar del compuesto 18 , seguido de la eliminación del grupo protector Boc y el acoplamiento mediado por HATU con ácido 4-hidroxibenzoico.
IIla-11	[M+H] ⁺ = 1059,5	 <p>, se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2.</p>

(continuación)

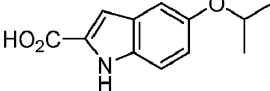
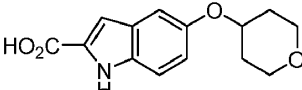
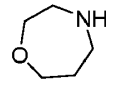
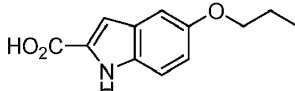
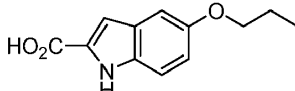
Tabla VIII - Compuestos de seco-CPI-enlazador elaborados siguiendo la figura 5		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
IIIa-12	$[M+H]^+ = 1045,4$	 , se usó en su lugar, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 .

Ejemplo 13 - Compuesto de seco-CPI Ia-15

- 5 La **figura 6** muestra el esquema para la síntesis del compuesto de seco-CPI **Ia-15**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. La Tabla IX muestra datos analíticos para el compuesto **Ia-15** y otros compuestos preparados de manera similar.

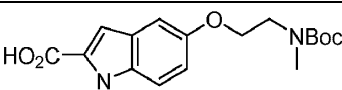
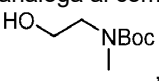
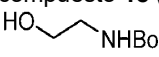
Tabla IX - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 6		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
Ia-03	$[M+H]^+ = 537,3$	 , elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 , se usó en lugar del compuesto 38 .
Ia-04	$[M+H]^+ = 549,1$	 , elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 , se usó en lugar del compuesto 38 .
Ia-05	$[M+H]^+ = 551,3$	 , elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 , se usó en lugar del compuesto 38 .
Ia-06	$[M+H]^+ = 549,2$	 , elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 , se usó en lugar del compuesto 38 .
Ia-07	$[M+H]^+ = 563,5$	 , elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2 , se usó en lugar del compuesto 38 .
Ia-12	$[M+H]^+ = 555,3$	 Se usó (N.º de reg. CAS 66616-71-5) en lugar del compuesto 38 .

(continuación)

Tabla IX - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 6		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
Ia-13	$[M+H]^+ = 537,3$	 <p>, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2, se usó en lugar del compuesto 38.</p>
Ia-14	$[M+H]^+ = 579,2$	 <p>, elaborado de forma análoga al compuesto 18 en la figura 2, se usó en lugar del compuesto 38.</p>
Ia-15	$[M+H]^+ = 563,4$	Como se representa
Ia-28	$[M+H]^+ = 551,1$	<p>se usó  en lugar de morfolina para elaborar el equivalente del compuesto 14 según el procedimiento de la figura 2 y</p>  <p>se usó  en lugar del compuesto 38.</p>

Ejemplo 14 - Compuesto de seco-CPI Ia-18

- 5 La **figura 7** muestra el esquema para la síntesis del compuesto de seco-CPI **Ia-18**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. La Tabla X muestra datos analíticos para el compuesto **Ia-18** y otro compuesto preparado de forma similar.

Tabla X - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 7		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
Ia-17	$[M+H]^+ = 552,2$	 <p>, elaborado de forma análoga al compuesto 18 (figura 2) usando , se usó en lugar del compuesto 40.</p>
Ia-18	$[M+H]^+ = 538,2$	El compuesto 40 se elaboró de forma análoga al compuesto 18 (figura 2), usando  .

10 *Ejemplo 15 - Compuestos de seco-CPI Ib-01 e Ib-02*

La **figura 8** muestra un esquema para la síntesis de los compuestos de seco-CPI **Ib-01** e **Ib-02**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. **Ib-01** $[M+H]^+ = 615,0$; **Ib-02** $[M+H]^+ = 659,4$.

15

Ejemplo 16 - Compuesto de seco-CPI Id-02

La **figura 9** muestra el esquema para la síntesis del compuesto de seco-CPI **Id-02**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. La Tabla XI muestra datos analíticos para el compuesto **Id-02** y otros compuestos preparados de manera similar.

20

Tabla XI - Compuestos de seco-CPI elaborados siguiendo la figura 9		
Compuesto N.º	Espectro de masas	Observaciones
Ic-01	$[M+H]^+ = 652,3$	Se usó el compuesto 48a en lugar del compuesto 50 .
Id-01	$[M+H]^+ = 614,1$	Se usó ácido 4-hidroxibenzoico en lugar del compuesto 50 .
Id-02	$[M+H]^+ = 613,1$	Como se representa.

Ejemplo 17 - Compuesto de seco-CPI Ia-25

La **figura 10** muestra el esquema para la síntesis de los compuestos de seco-CPI **Ia-25**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores.

El compuesto **Ia-26** se preparó de forma análoga, usando 1-metilpiperazina en lugar de 1-Cbz-piperazina.

Los datos espectrales de masa para los dos compuestos fueron: **Ia-25** $[M+H]^+ = 493,2$; **Ia-26** $[M+H]^+ = 507,3$.

Ejemplo 18 - Compuesto de seco-CPI Ia-27

La **figura 11** muestra el esquema para la síntesis de los compuestos de seco-CPI **Ia-27**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. Datos espectrales de masa para el compuesto **Ia-27**: $[M+H]^+ = 588,1$.

Ejemplo 19 - Compuesto de seco-CPI Ia-29

La **figura 12** muestra el esquema para la síntesis del compuesto de seco-CPI **Ia-29**. Los reactivos usados y las condiciones para su uso se conocen en la materia y/o se han ilustrado en los ejemplos anteriores. Datos espectrales de masa para el compuesto **Ia-29**: $[M+H]^+ = 574,1$.

Ejemplo 20 - Actividad biológica de los conjugados

Los compuestos de seco-CPI-enlazador **IIIa-01**, **IIIa-02**, **IIIa-03** e **IIIa-04** se conjugaron con el anticuerpo anti mesotelina 6A4 (Terrett *et al.*, documento US 8.268.970 B2 (2012)) generalmente siguiendo el procedimiento de adición de Michael del Ejemplo 1 anterior. Los conjugados de anticuerpo-fármaco resultantes se denominaron **6A4/IIIa-01 ADC**, **6A4/IIIa-02 ADC**, **6A4/IIIa-03 ADC** y **6A4/IIIa-04 ADC**, respectivamente.

Adicionalmente, los compuestos de seco-CPI-enlazador **IIIa-06** e **IIIa-12** se conjugaron con el anticuerpo anti mesotelina 6A4 diseñado para tener una sustitución N297A (EU como en Kabat) en la cadena pesada, generalmente siguiendo el procedimiento de conjugación mediado por transglutaminasa del Ejemplo 2. La sustitución N297A anula la glucosilación del anticuerpo y hace que la glutamina 295 cercana (Q295) esté disponible como un aceptor de amina para una reacción de transamidación catalizada por transglutaminasa (Jeger *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9995). Los conjugados de anticuerpo-fármaco resultantes se denominaron **6A4(N297A)/IIIa-06 ADC** y **6A4(N297A)/IIIa-12 ADC**, respectivamente.

La actividad de estos ADC frente a las células cancerosas H226 y N87, ambas de las cuales expresan mesotelina, se midió usando un ensayo de incorporación de timidina 3H (Cheng *et al.*, documento US 8.394.922 B2 (2013)). Los resultados se presentan en la Tabla XII.

Tabla XII - Actividad biológica de los conjugados		
Conjugado	CE ₅₀ (nM)	
	Células H226	Células N87
6A4/IIIa-01 ADC	1,2, 0,45	256
6A4/IIIa-02 ADC	5,8	-
6A4/IIIa-03 ADC	0,3	3,5
6A4/IIIa-04 ADC	0,10	0,12
6A4(N297A)/IIIa-06 ADC	0,18	-
6A4(N297A)/IIIa-12 ADC	0,20	-

La descripción detallada anterior de la invención incluye fragmentos que están relacionados principal o exclusivamente con partes o aspectos particulares de la invención. Debe entenderse que esto es por claridad y conveniencia, que una característica particular puede ser relevante en más de solo el fragmento en el que se desvela, y que la divulgación en el presente documento incluye todas las combinaciones apropiadas de información que se encuentran en los diferentes fragmentos. De manera similar, aunque las diversas figuras y descripciones en el presente documento se refieren a realizaciones específicas de la invención, debe entenderse que cuando se desvela una característica específica en el contexto de una figura o realización particular, dicha característica también se puede usar, en la medida apropiada, en el contexto de otra figura o realización, junto con otra característica, o en la invención en general.

Además, aunque la presente invención se ha descrito particularmente en términos de determinadas realizaciones preferidas, la invención no se limita a dichas realizaciones preferidas. Más bien, el alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

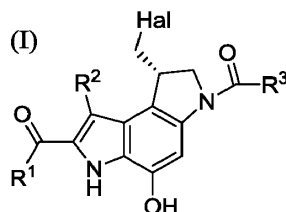
REFERENCIAS

A continuación se proporcionan menciones completas de las siguientes referencias citadas de forma abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anterior en esta memoria descriptiva.

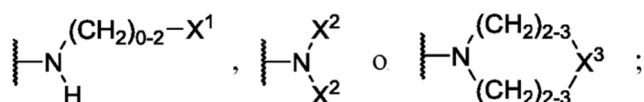
- Boger, documento US 6.281.354 B1 (2001).
 Boger, documento US 6.548.530 B1 (2003).
 Boger y Johnson, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 1995, 92, 3642.
 Boger *et al.*, J. Org. Chem. 1990, 55, 5823.
 Boger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 4987.
 Boger *et al.*, Synthesis 1999, SI, 1505.
 Boger *et al.*, J. Org. Chem. 2000, 65, 4101.
 Boyd *et al.*, documento US 2008/0279868 A1 (2008).
 Chari *et al.*, Cancer Res. 1995, 55, 4079.
 Chen *et al.*, documento US 8.664.407 B2 (2014).
 Ducry *et al.*, Bioconjug. Chem. 2010, 21, 5.
 Gangwar *et al.*, documento US 7.968.586 B2 (2011).
 Hurley *et al.*, Science 1984, 226, 843.
 Kobayashi *et al.*, Cancer Res. 1994, 54, 2404.
 Lajiness *et al.*, J. Med. Chem. 2010, 53, 7731.
 Li *et al.*, Cancer Res. 1992, 52, 4904.
 Nagamura y Saito, Chem. Heterocyclic Compounds 1998, 34 (12), 1386.
 Nagamura *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 1996, 44 (9), 1723.
 Ng *et al.*, documento US 7.129.261 B2 (2006).
 Ng *et al.*, documento US 7.507.420 B2 (2009).
 Ng *et al.*, documento US 8.034.959 B2 (2011).
 Schrama *et al.*, Nature Rev. Drug Disc. 2006, 5, 147-159.
 Stephenson *et al.*, J Org Chem. 2015, 80, 9454.
 Sufi *et al.*, documento US 8461,117 B2 (2013).
 Tichenor *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 10858.
 Tietze *et al.*, ChemBioChem 2001, 2, 758.
 Tietze *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 2008, 16, 6312.
 Zhang *et al.*, documento US 8.852.599 B2 (2014).
 Zhao *et al.*, documento US 7.655.660 B2 (2010).

REIVINDICACIONES

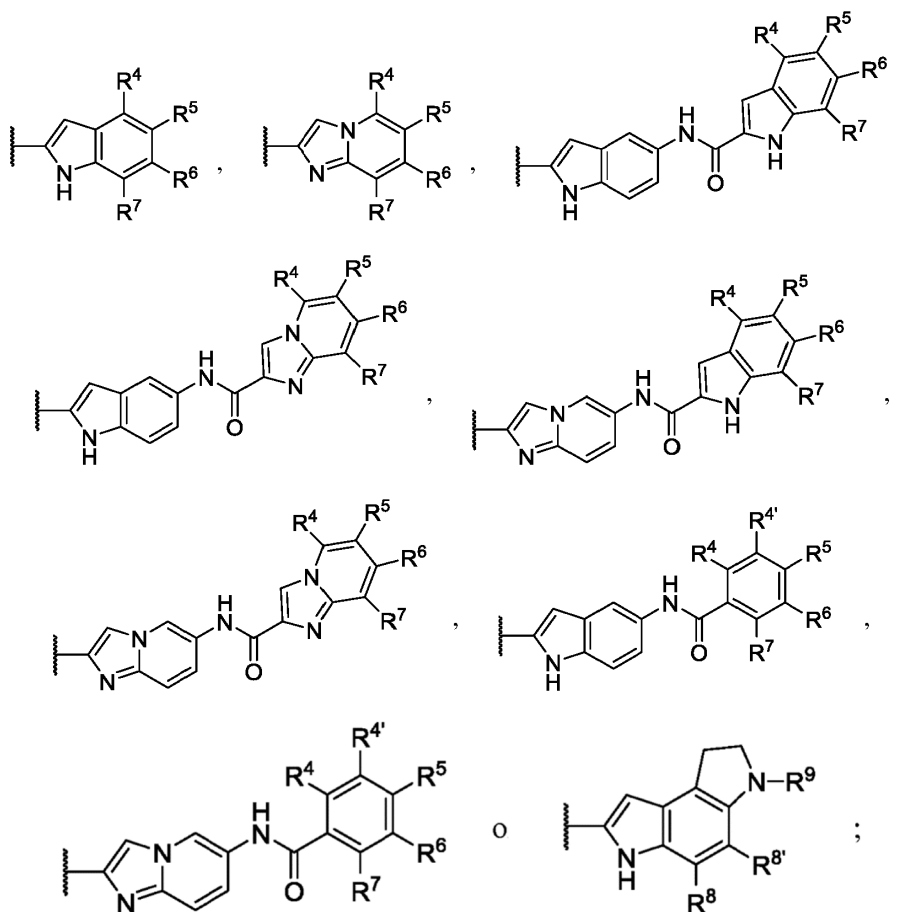
1. Un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I)



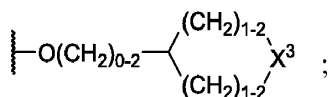
en la que
Hal es Cl o Br;
R¹ es



R² es H, alquilo C₁-C₃, CO₂H, CO₂(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquilo C₁-C₃) o C(=O)N(alquilo C₁-C₃)₂;
R³ es



R⁴, R^{4'}, R⁵, R⁶ o R⁷ son independientemente H, OMe, OH, un grupo arilo de 6 miembros, un grupo heteroarilo de 5 o 6 miembros, NH₂, NHMe, NMe₂, NH(alquilo C₂-C₄), N(alquilo C₂-C₄)₂, NHC(=O)X¹, O(alquilo C₂-C₄), O(CH₂)₀₋₂(cicloalquilo C₃-C₆), O(CH₂)₀₋₂X¹, o



en la que un grupo alquilo C₂-C₄ puede estar sin sustituir o sustituido con OCH₂CH₂OH, OCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂OH, NHCH₂CH₂NH₂, OH o NH₂ y un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con alquilo C₁-C₂, OH, NH₂, NH(alquilo C₁-C₂), N(alquilo C₁-C₂)₂, F, Cl, Br, NO₂ o CN;

con la condición de que al menos uno de R⁴, R^{4'}, R⁵, R⁶ y R⁷ sea distinto de H;

R⁸ y R^{8'} son independientemente H, OH, O(alquilo C₁-C₃), Cl, Br, F, O(CH₂)₂₋₄NH₂ u O(CH₂)₂₋₄OH; R⁹ es H, C(=O)(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH(alquilo C₁-C₃), C(=O)(alquilo C₁-C₃)₂, (CH₂)₂₋₄OH, (CH₂)₂₋₄O(alquilo C₁-C₃), (CH₂)₂₋₄NH₂, (CH₂)₂₋₄NH(alquilo C₁-C₃) o (CH₂)₂₋₄N(alquilo C₁-C₃)₂;

cada X¹ es independientemente un grupo arilo de 6 miembros o un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros que está sin sustituir o sustituido con alquilo C₁-C₃, OH, O(alquilo C₁-C₃), NH₂, NH(alquilo C₁-C₃), N(alquilo C₁-C₃)₂, F, Cl, Br, NO₂ o CN;

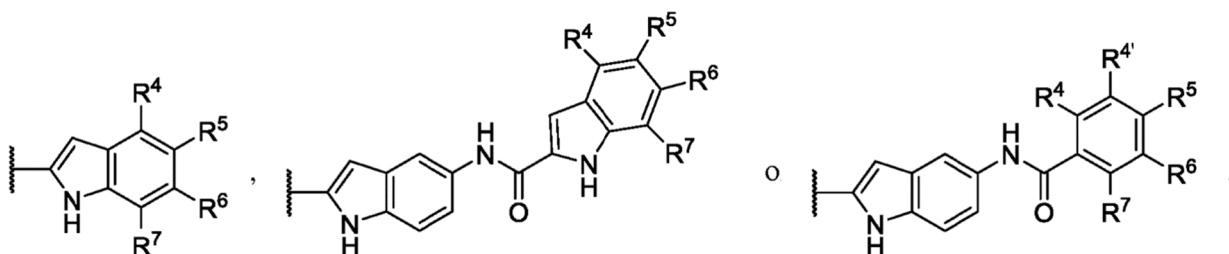
cada X² es independientemente H, Me o un grupo alquilo C₂-C₄ que puede estar sin sustituir o sustituido con OCH₂CH₂OH, OCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂OH, NHCH₂CH₂NH₂, OH o NH₂; y

cada X³ es independientemente O, NH, N(alquilo C₁-C₃) o S;

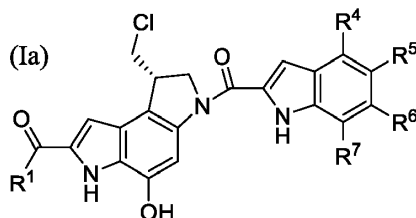
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R² es H y Hal es Cl.

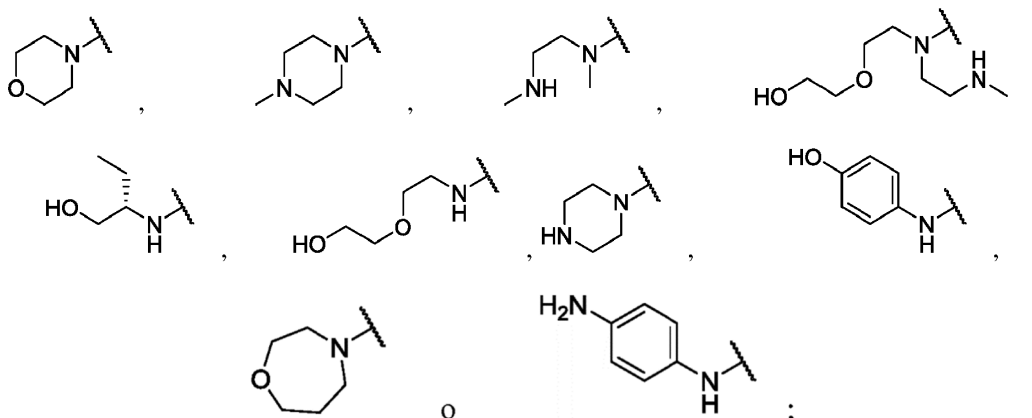
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R³ es



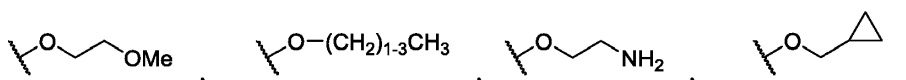
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ia):

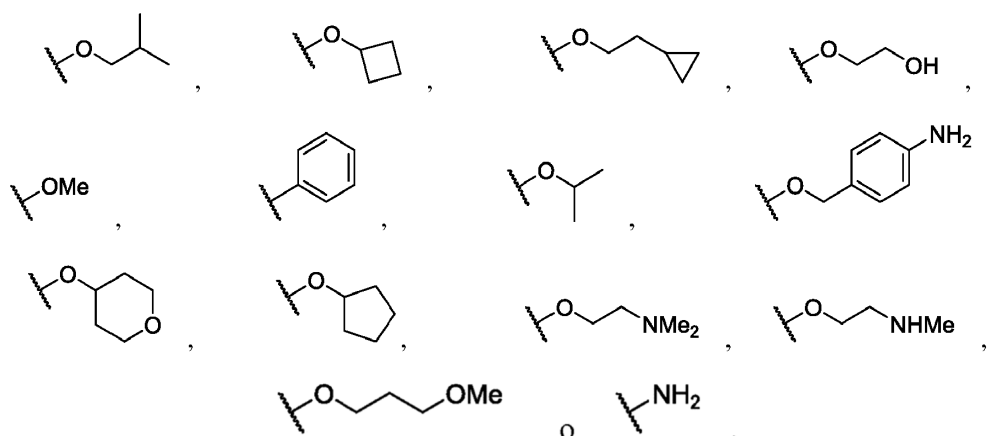


5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que R⁴, R⁶ y R⁷ son cada uno H, R¹ es



y R⁵ es



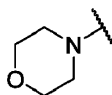


5

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^1 es un grupo cuyo compuesto correspondiente R^1H tiene un valor de CLogP de menos de 0,300.

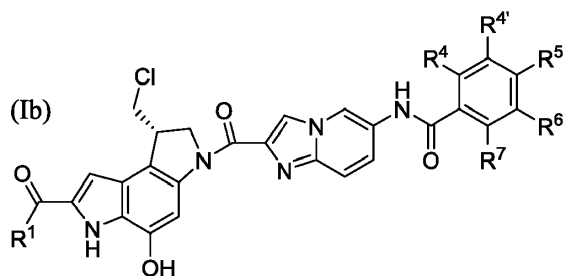
10

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que R^1 es



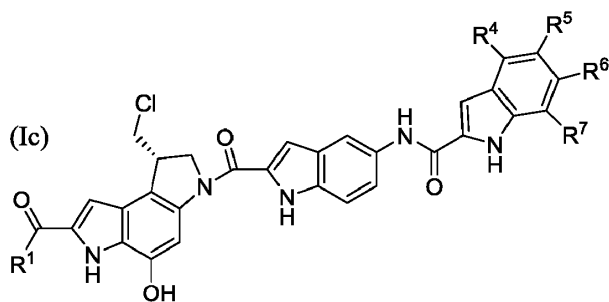
15

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ib):



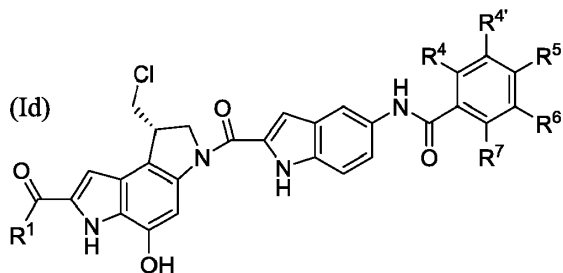
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ic):

20

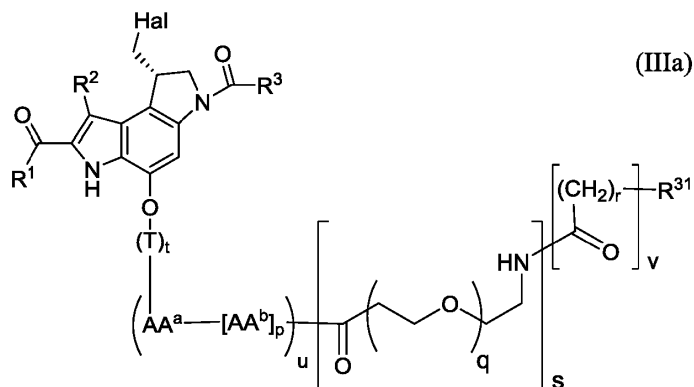


10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Id):

25



11. Un compuesto de seco-CPI-enlazador, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIa):



en la que

T es un grupo de autoinmolación;

t es 0 o 1;

AA^a y cada uno de AA^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

u es 0 o 1;

p es 1, 2, 3 o 4;

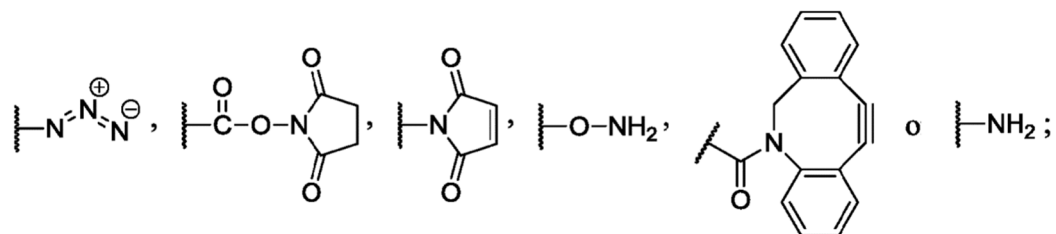
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);

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

s es 0 o 1;

v es 0 o 1;

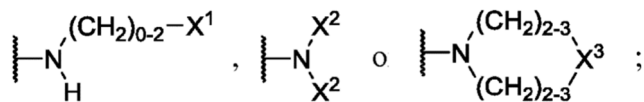
R³¹ es H,



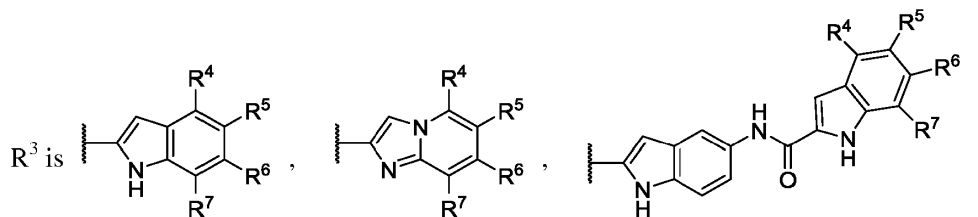
con la condición de que R³¹ pueda ser H solamente si s es 1 y v es 0 y que v pueda ser 0 solo si s es 1 y R³¹ es H;

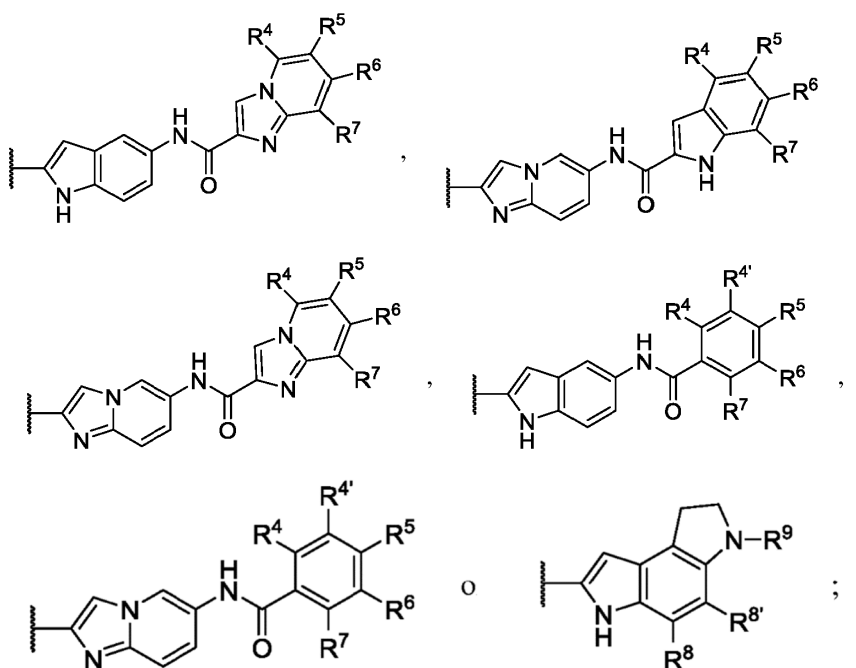
Hal es Cl o Br;

R¹ es

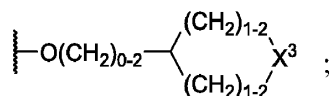


R² es H, alquilo C₁-C₃, CO₂H, CO₂(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH(alquilo C₁-C₃) o C(=O)N(alquilo C₁-C₃)₂;





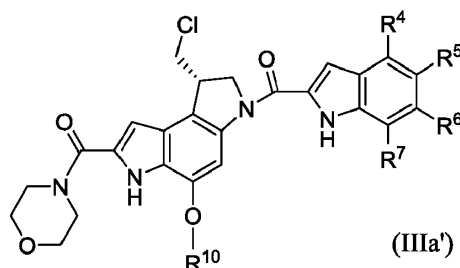
R^4 , $R^{4'}$, R^5 , R^6 o R^7 son independientemente H, OMe, OH, un grupo arilo de 6 miembros, un grupo heteroarilo de 5 o 6 miembros, NH_2 , $NHMe$, NMe_2 , $NH(\text{alquilo } C_2-C_4)$, $N(\text{alquilo } C_2-C_4)_2$, $NHC(=O)X^1$, $O(\text{alquilo } C_2-C_4)$, $O(CH_2)_{0-2}(\text{cicloalquilo } C_3-C_6)$, $O(CH_2)_{0-2}X^1$, o



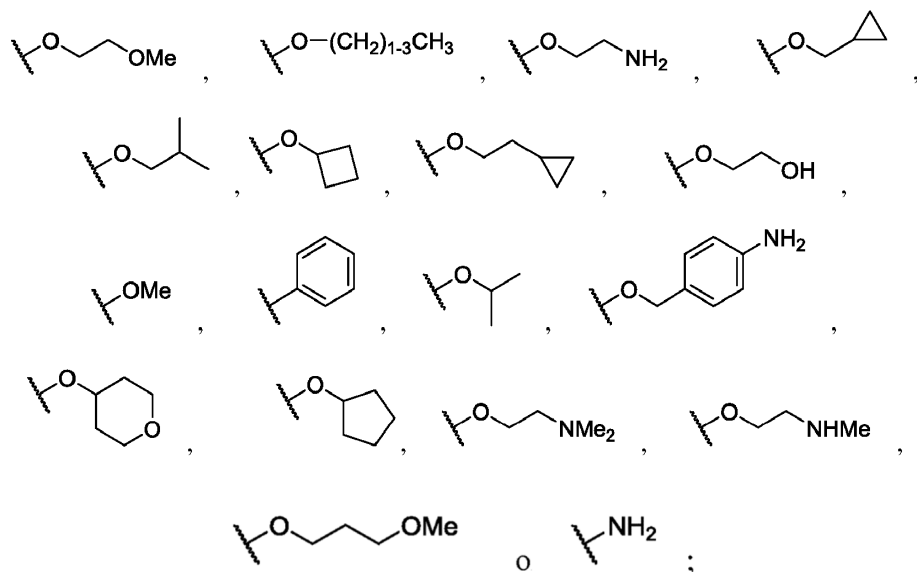
en la que un grupo alquilo C_2-C_4 puede estar sin sustituir o sustituido con OCH_2CH_2OH , $OCH_2CH_2NH_2$, $NHCH_2CH_2OH$, $NHCH_2CH_2NH_2$, OH o NH_2 y un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con alquilo C_1-C_2 , OH, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_1-C_2)$, $N(\text{alquilo } C_1-C_2)_2$, F, Cl, Br, NO_2 o CN; con la condición de que al menos uno de R^4 , $R^{4'}$, R^5 , R^6 y R^7 sea distinto de H;

R^8 y $R^{8'}$ son independientemente H, OH, $O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, Cl, Br, F, $O(CH_2)_{2-4}NH_2$ u $O(CH_2)_{2-4}OH$; R^9 es H, $C(=O)(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $C(=O)NH_2$, $C(=O)NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $C(=O)(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, $(CH_2)_{2-4}OH$, $(CH_2)_{2-4}O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $(CH_2)_{2-4}NH_2$, $(CH_2)_{2-4}NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$ o $(CH_2)_{2-4}N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$; cada X^1 es independientemente un grupo arilo de 6 miembros o un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros que está sin sustituir o sustituido con alquilo C_1-C_3 , OH, $O(\text{alquilo } C_1-C_3)$, NH_2 , $NH(\text{alquilo } C_1-C_3)$, $N(\text{alquilo } C_1-C_3)_2$, F, Cl, Br, NO_2 o CN; cada X^2 es independientemente H, Me o un grupo alquilo C_2-C_4 que puede estar sin sustituir o sustituido con OCH_2CH_2OH , $OCH_2CH_2NH_2$, $NHCH_2CH_2OH$, $NHCH_2CH_2NH_2$, OH o NH_2 ; y cada X^3 es independientemente O, NH, $N(\text{alquilo } C_1-C_3)$ o S; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

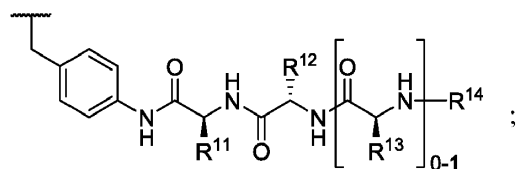
12. Un compuesto de seco-CPI-enlazador de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIa'):



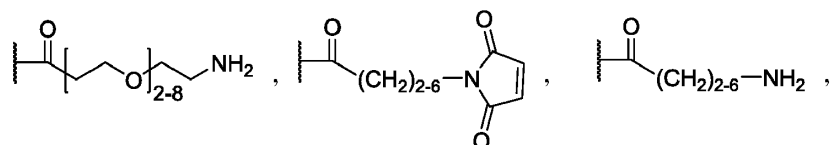
en la que R^4 , R^6 y R^7 son cada uno H; y R^5 es



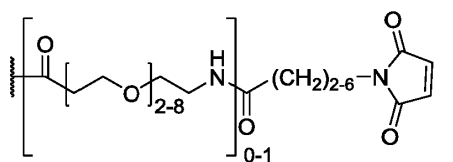
R¹⁰ es



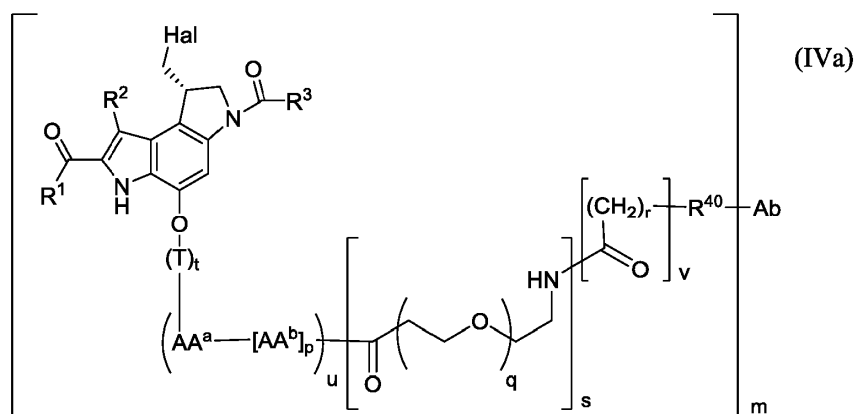
R¹¹, R¹² y R¹³ son independientemente H, CH₃, CH(CH₃)₂, CH₂CO₂H, CH₂CH₂CO₂H, CH₂C(=O)NH₂, CH₂CH₂C(=O)NH₂, (CH₂)₄NH₂, (CH₂)₃NHC(=NH)NH₂ o (CH₂)₃NHC(=O)NH₂; y R¹⁴ es



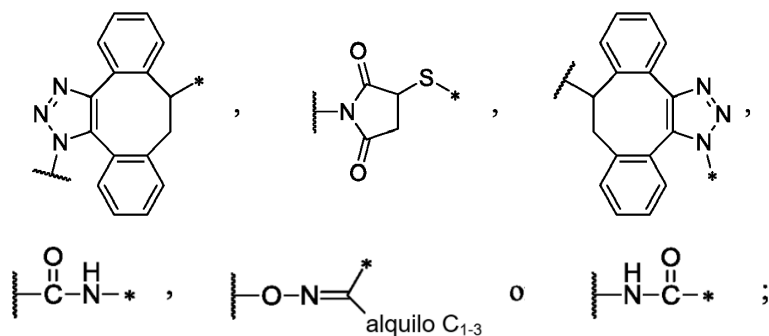
o



13. Un conjugado de anticuerpo-fármaco, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IVa):



en la que
Ab es un anticuerpo;
R⁴⁰ es un enlace,



en donde la valencia abierta de R⁴⁰ que está unido al Ab se representa por un asterisco (*) y la valencia abierta de R⁴⁰ que está unido a (CH₂)_r se representa por una línea ondulada (~~~~~);

m es 1, 2, 3 o 4;

v es 0 o 1, con la condición de que v pueda ser 0 solo si s es 1 y R⁴⁰ es un enlace y de que R⁴⁰ pueda ser un enlace solo si v es 0 y s es 1;

T es un grupo de autoinmolación;

t es 0 o 1;

AA^a y cada uno de AA^b se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

u es 0 o 1;

p es 1, 2, 3 o 4;

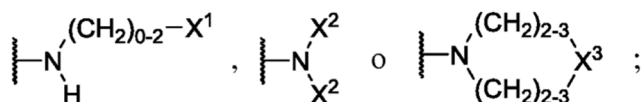
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);

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

s es 0 o 1;

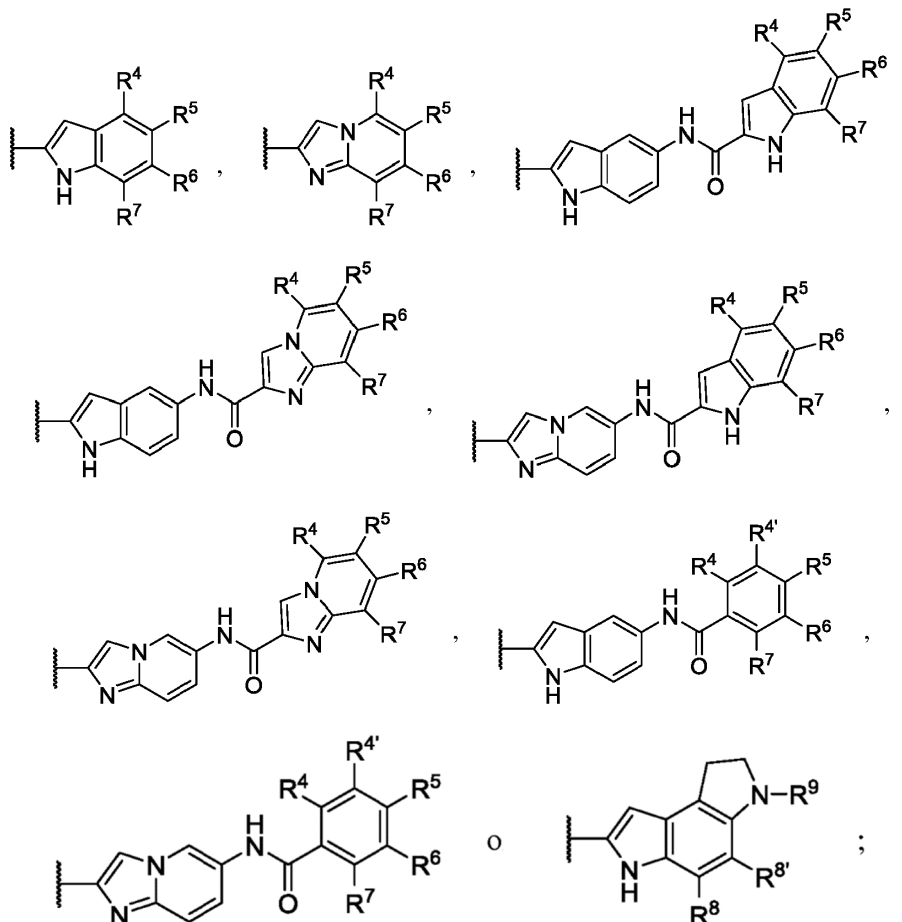
Hal es Cl o Br;

R¹ es



R^2 es H, alquilo C₁-C₃, CO₂H, CO₂(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH(alquilo C₁-C₃) o C(=O)N(alquilo C₁-C₃)₂;
 R^3 es

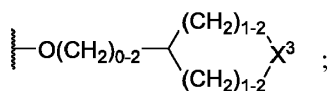
5



10

15

R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 , R^6 o R^7 son independientemente H, OMe, OH, un grupo arilo de 6 miembros, un grupo heteroarilo de 5 o 6 miembros, NH₂, NHMe, NMe₂, NH(alquilo C₂-C₄), N(alquilo C₂-C₄)₂, NHC(=O)X¹, O(alquilo C₂-C₄), O(CH₂)₀₋₂(cicloalquilo C₃-C₆), O(CH₂)₀₋₂X¹, o



20

en la que un grupo alquilo C₂-C₄ puede estar sin sustituir o sustituido con OCH₂CH₂OH, OCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂OH, NHCH₂CH₂NH₂, OH o NH₂ y un grupo arilo o heteroarilo puede estar sustituido con alquilo C₁-C₂, OH, NH₂, NH(alquilo C₁-C₂), N(alquilo C₁-C₂)₂, F, Cl, Br, NO₂ o CN; con la condición de que al menos uno de R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 , R^6 y R^7 sea distinto de H;

25

R^8 y R^8 son independientemente H, OH, O(alquilo C₁-C₃), Cl, Br, F, O(CH₂)₂₋₄NH₂ u O(CH₂)₂₋₄OH;
 R^9 es H, C(=O)(alquilo C₁-C₃), C(=O)NH₂, C(=O)NH(alquilo C₁-C₃), C(=O)(alquilo C₁-C₃)₂, (CH₂)₂₋₄OH, (CH₂)₂₋₄O(alquilo C₁-C₃), (CH₂)₂₋₄NH₂, (CH₂)₂₋₄NH(alquilo C₁-C₃) o (CH₂)₂₋₄N(alquilo C₁-C₃)₂;
 cada X¹ es independientemente un grupo arilo de 6 miembros o un grupo heteroarilo de 5 a 6 miembros que está sin sustituir o sustituido con alquilo C₁-C₃, OH, O(alquilo C₁-C₃), NH₂, NH(alquilo C₁-C₃), N(alquilo C₁-C₃)₂, F, Cl, Br, NO₂ o CN;

30

cada X² es independientemente H, Me o un grupo alquilo C₂-C₄ que puede estar sin sustituir o sustituido con OCH₂CH₂OH, OCH₂CH₂NH₂, NHCH₂CH₂OH, NHCH₂CH₂NH₂, OH o NH₂; y
 cada X³ es independientemente O, NH, N(alquilo C₁-C₃) o S;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35

14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o un conjugado del mismo de acuerdo con la reivindicación 13 con un anticuerpo, para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer.
- 5 15. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario o cáncer de colon.
16. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el compuesto está conjugado con un anticuerpo.
- 10 17. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario o cáncer de colon.

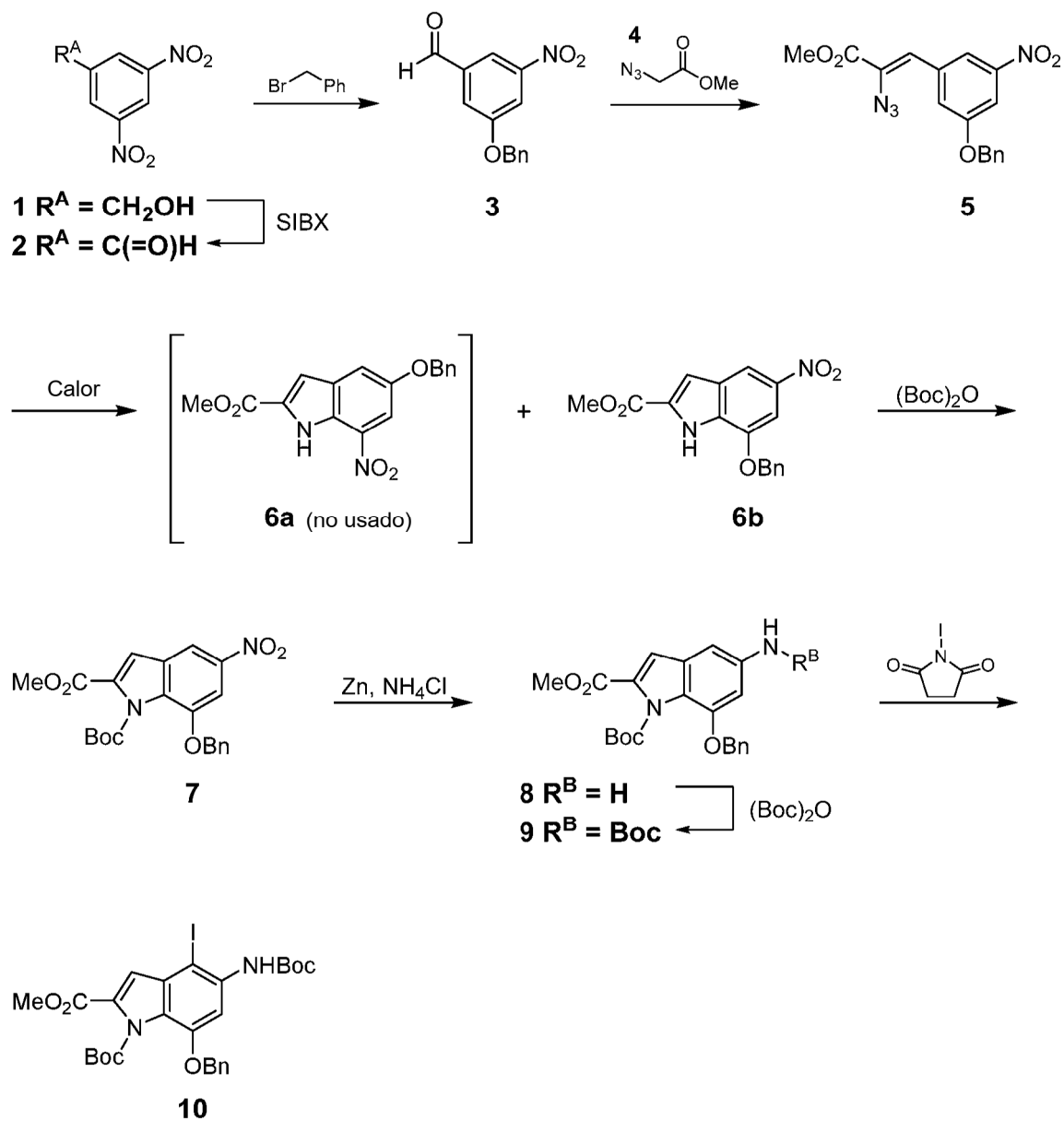
FIG. 1A

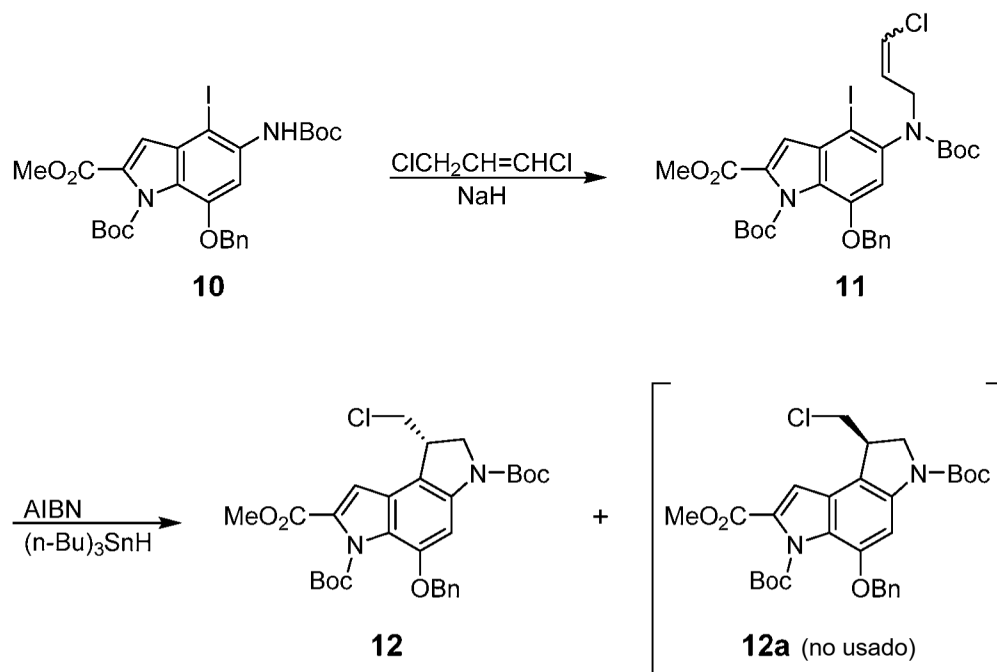
FIG. 1B

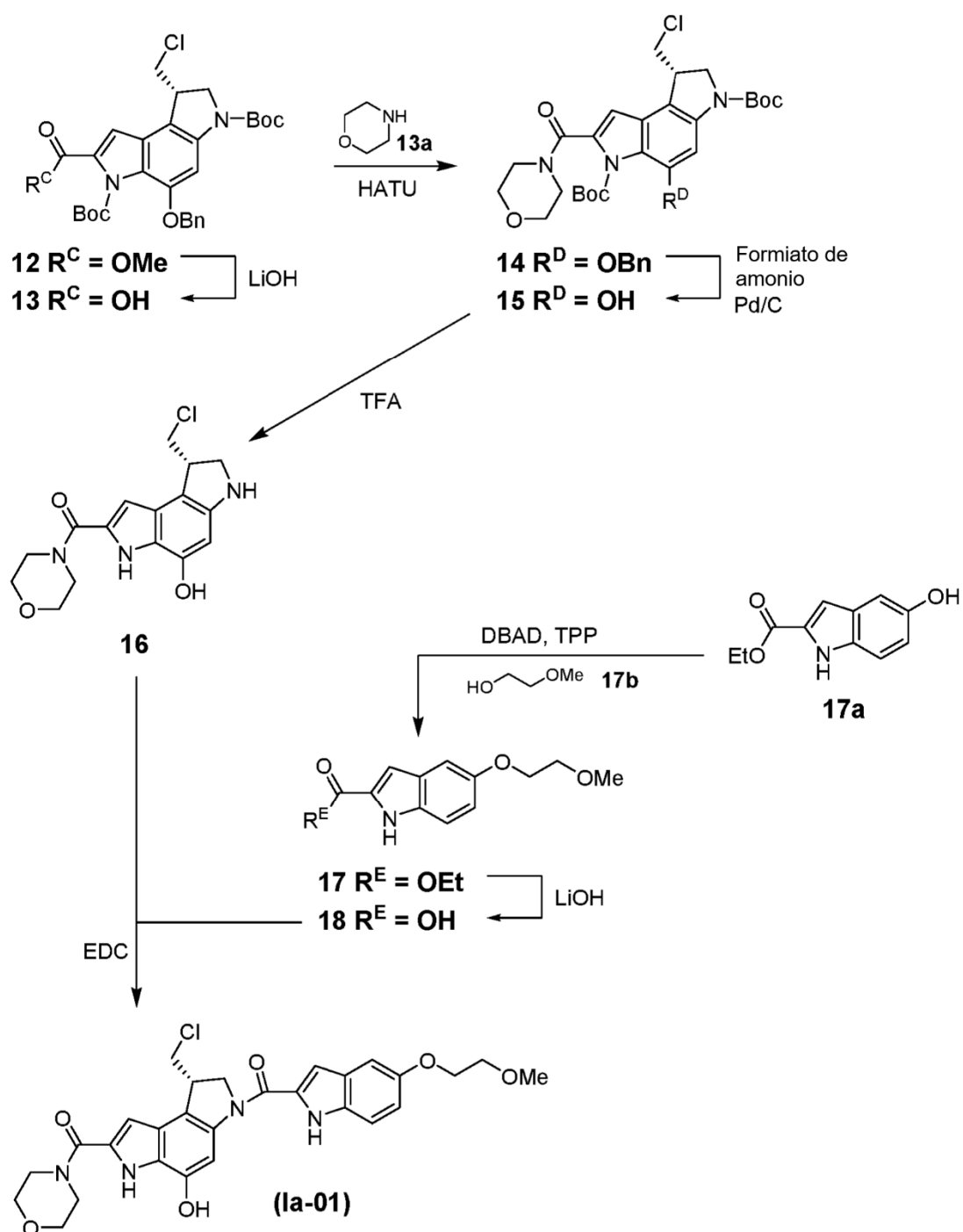
FIG. 2

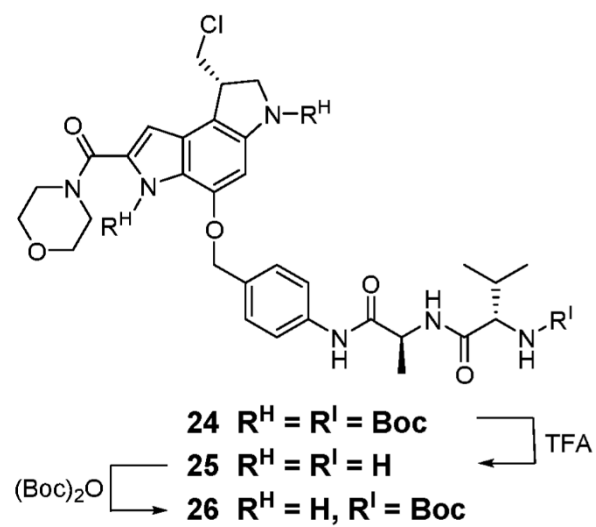
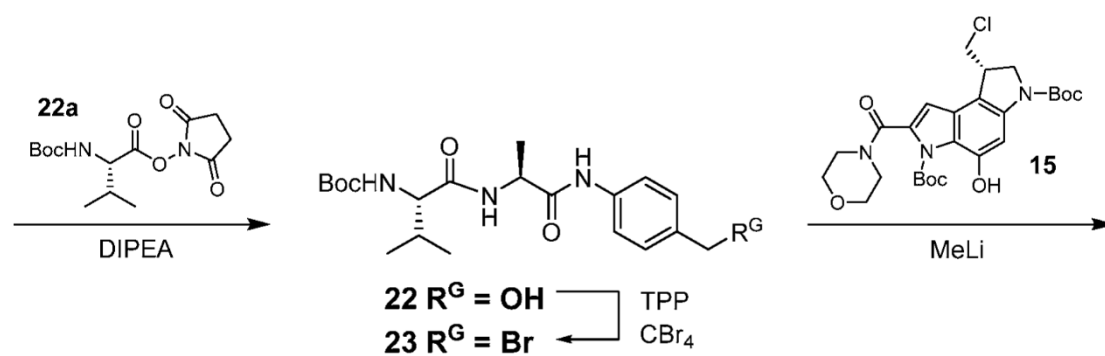
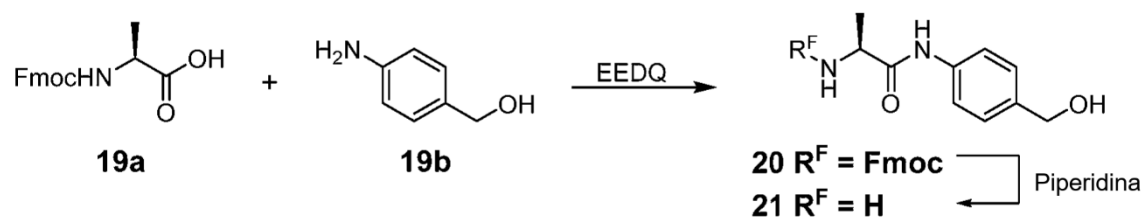
FIG. 3A

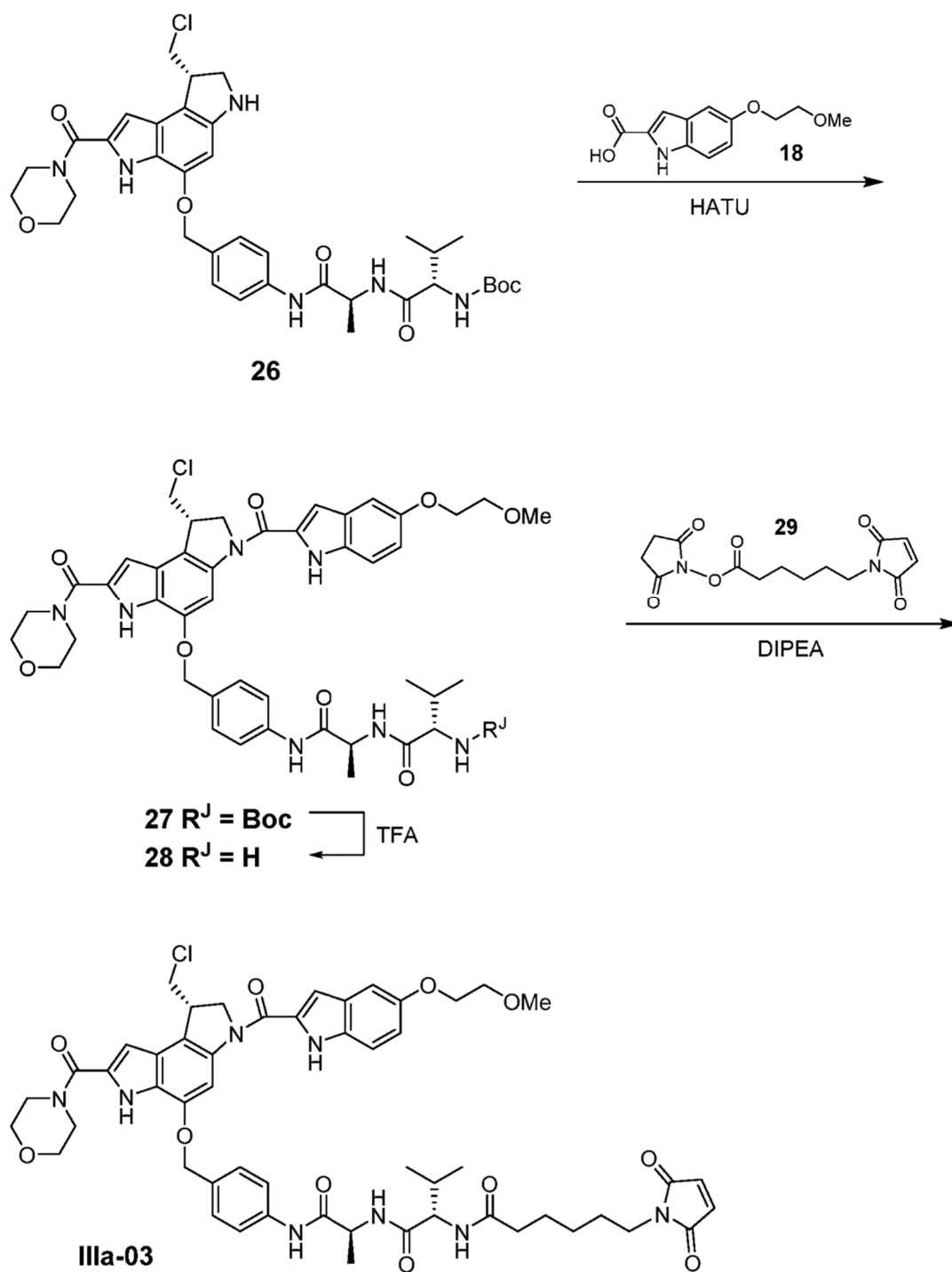
FIG. 3B

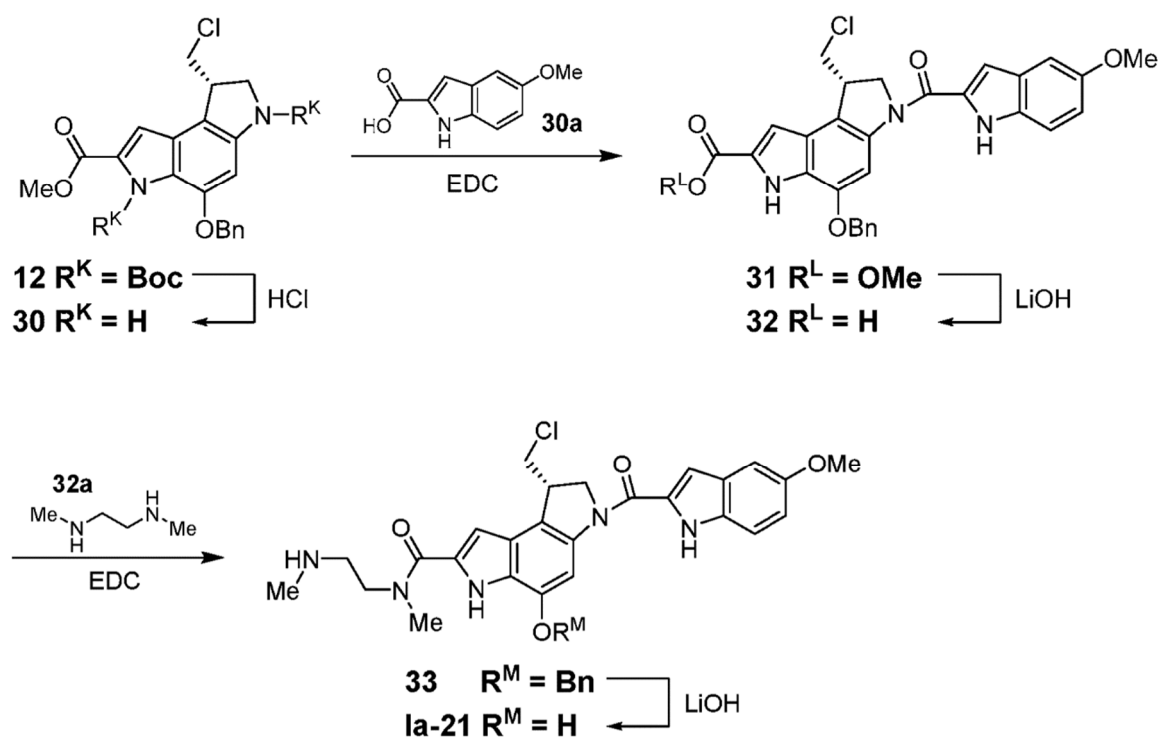
FIG. 4

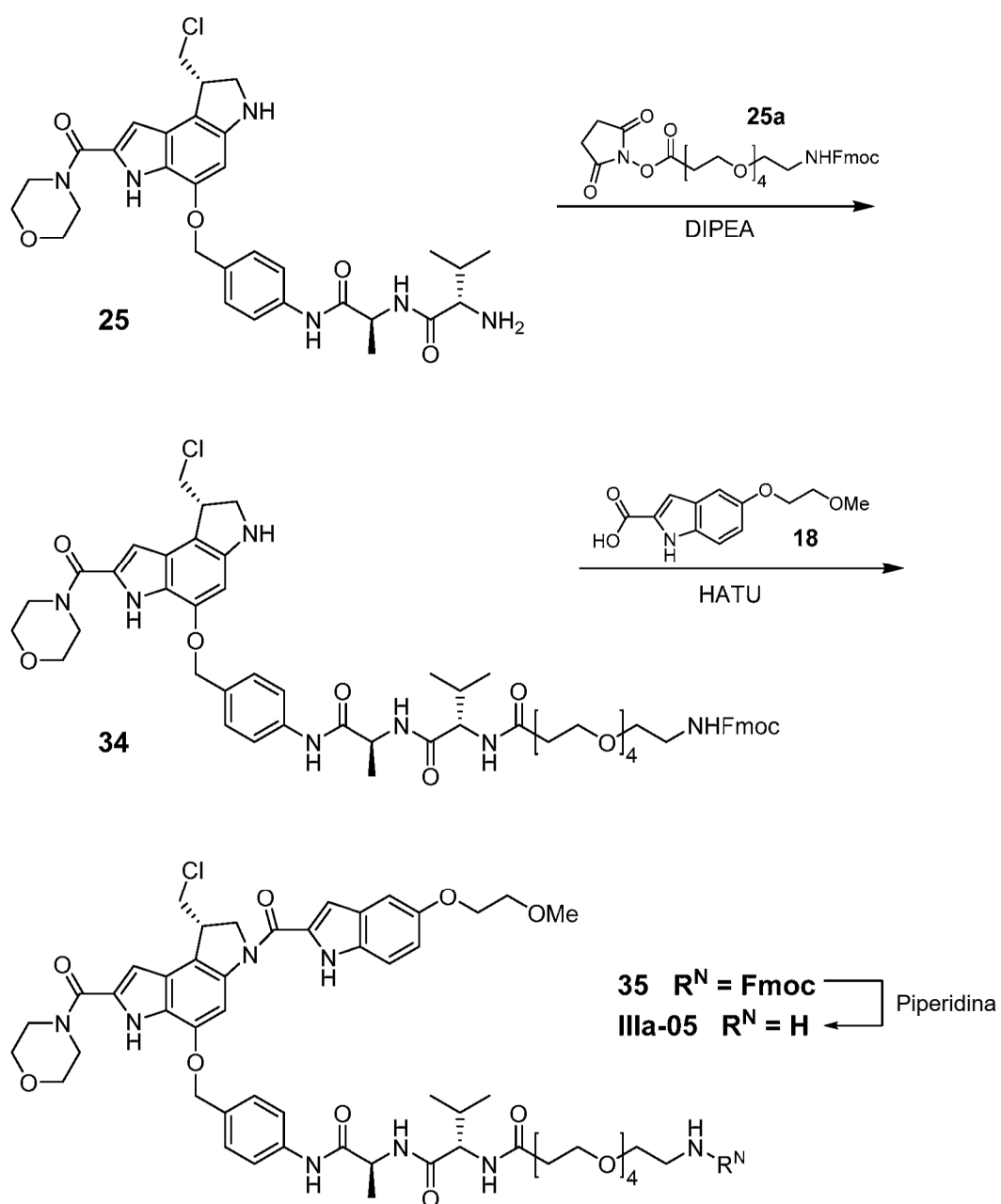
FIG. 5

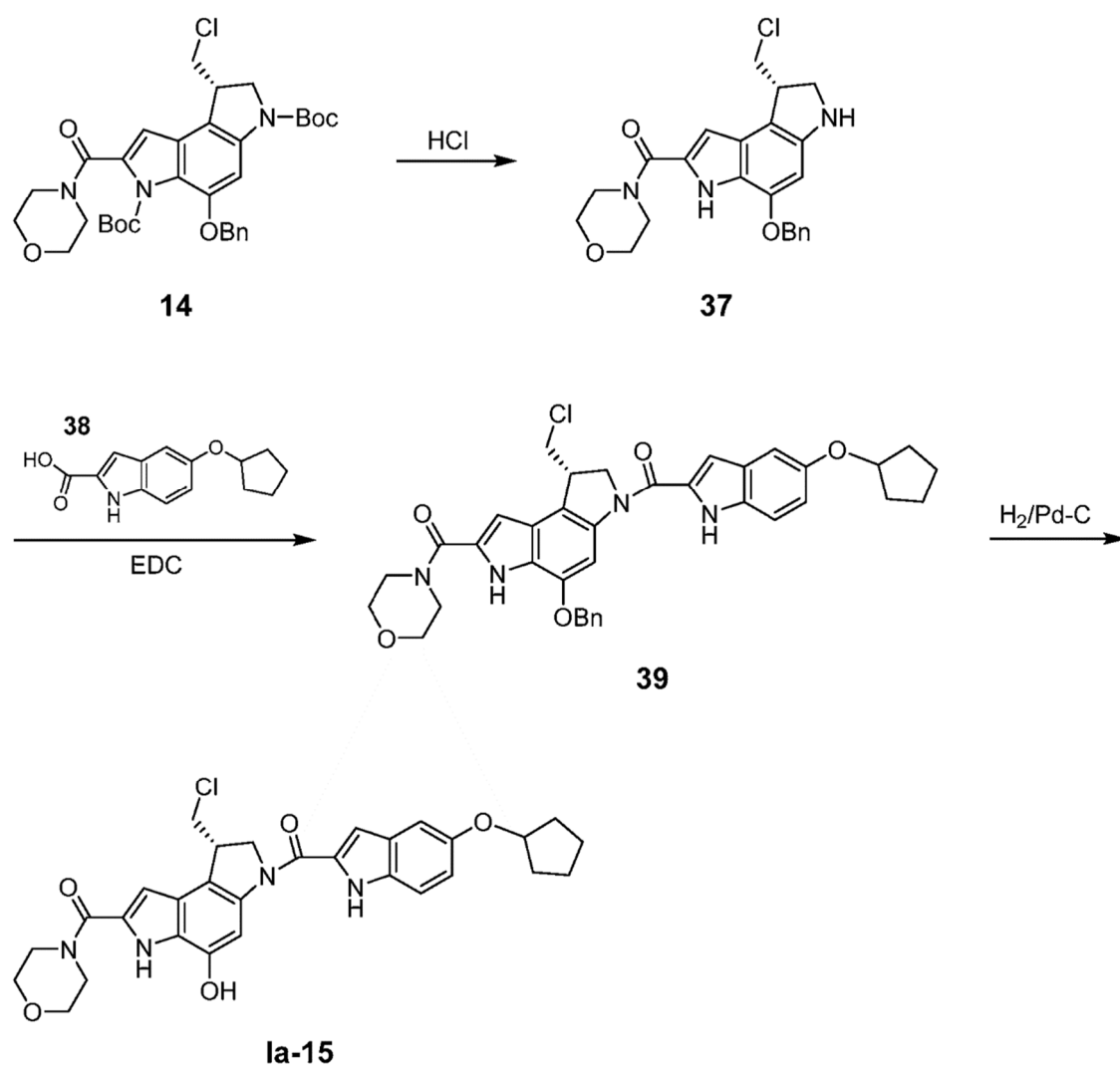
FIG. 6

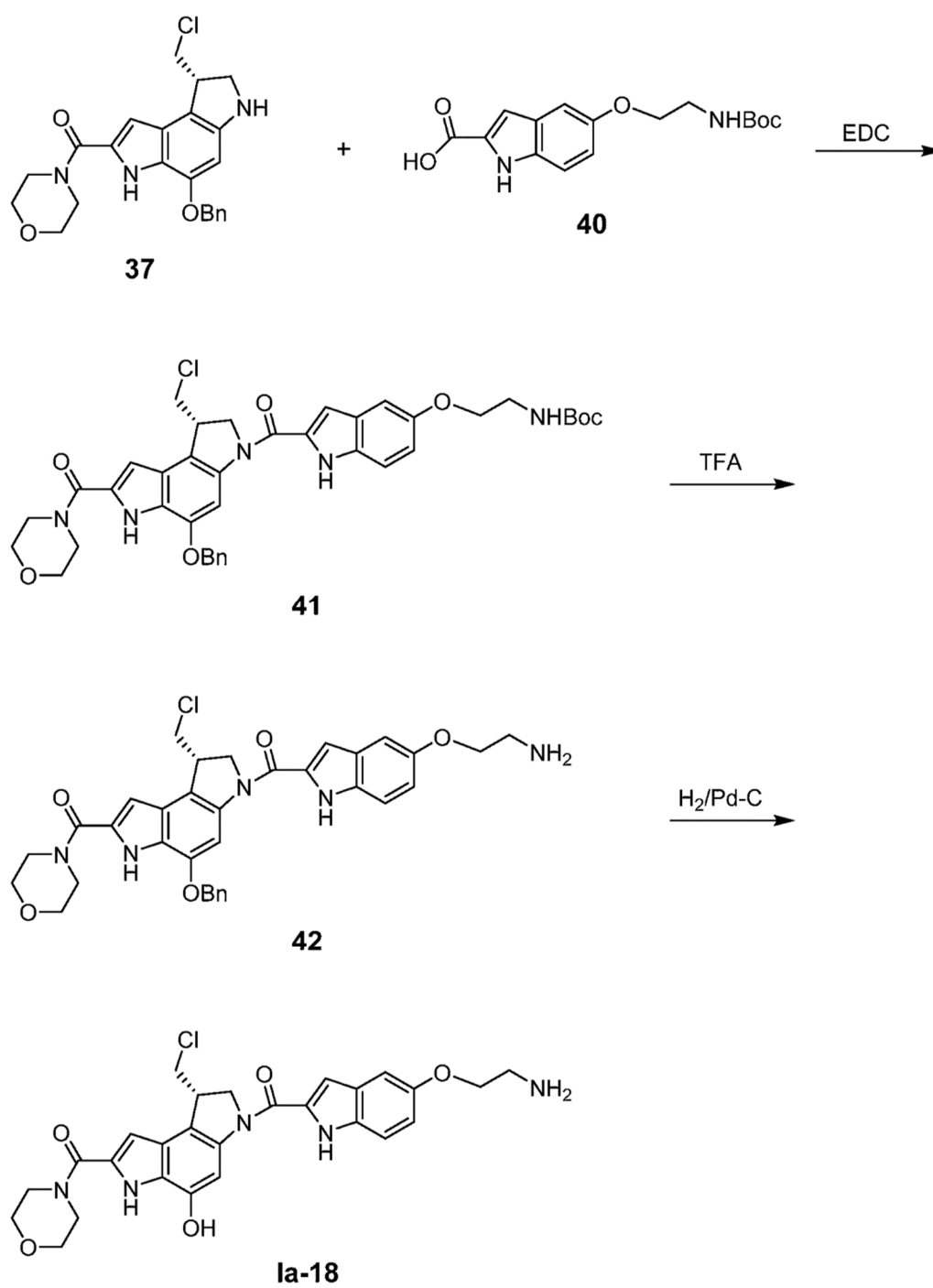
FIG. 7

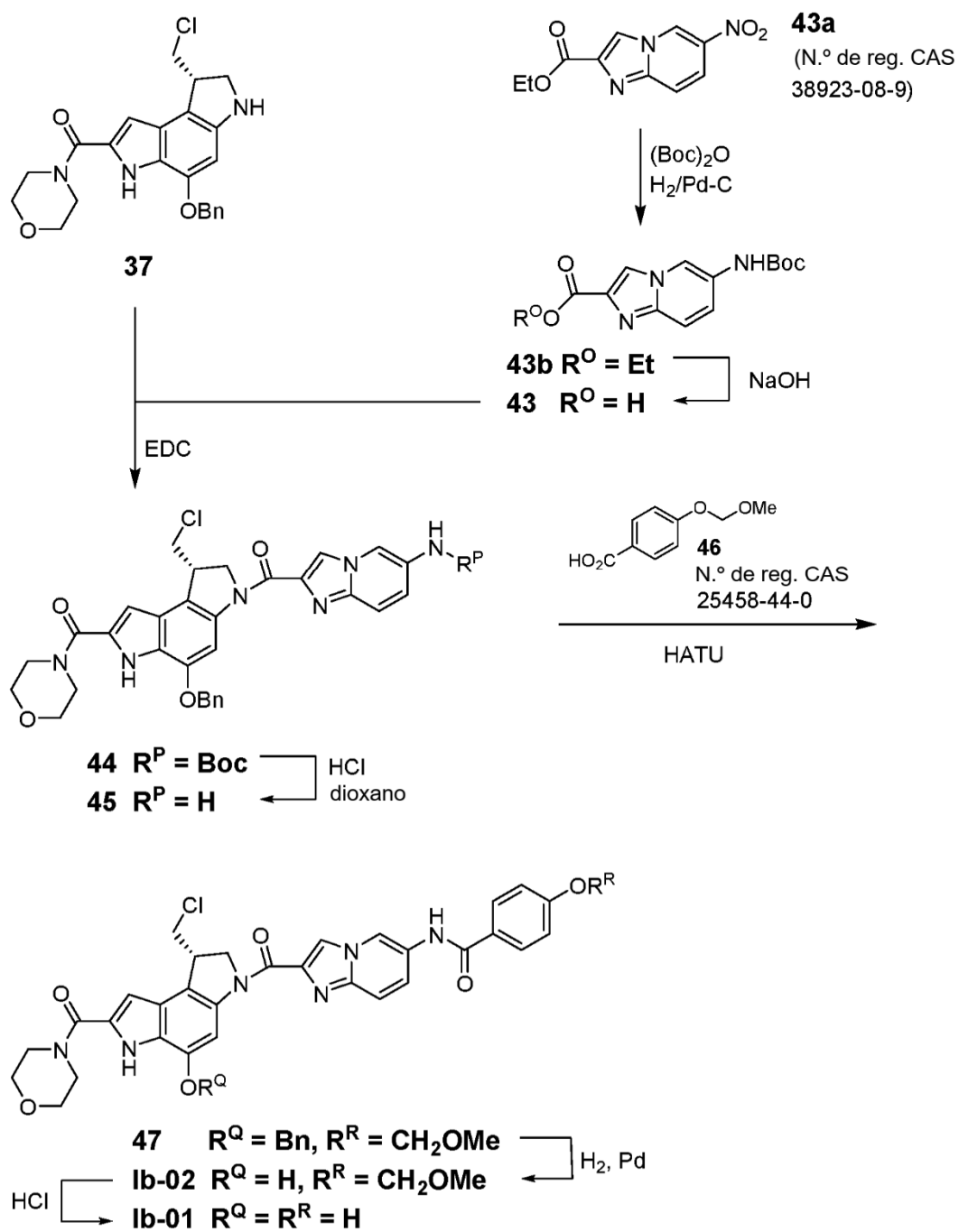
FIG. 8

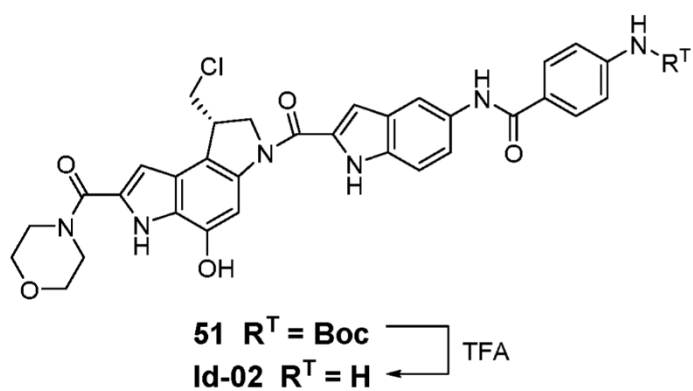
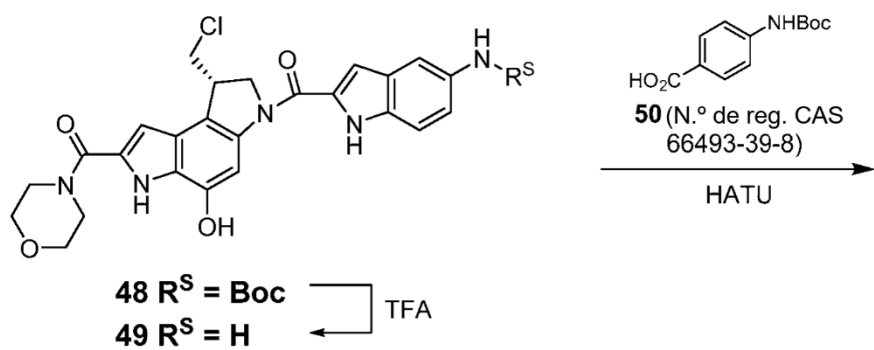
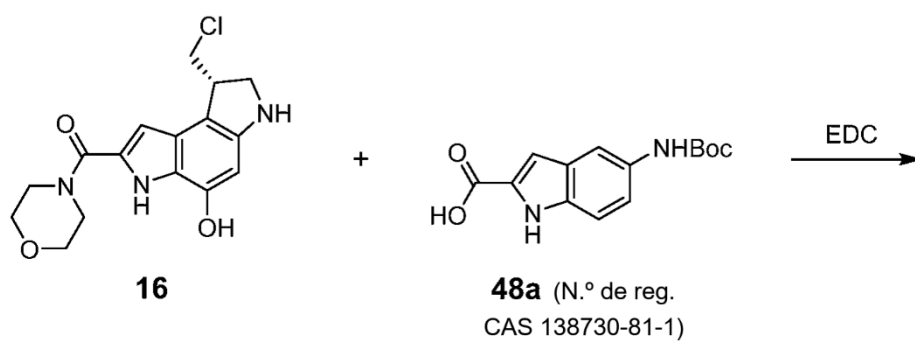
FIG. 9

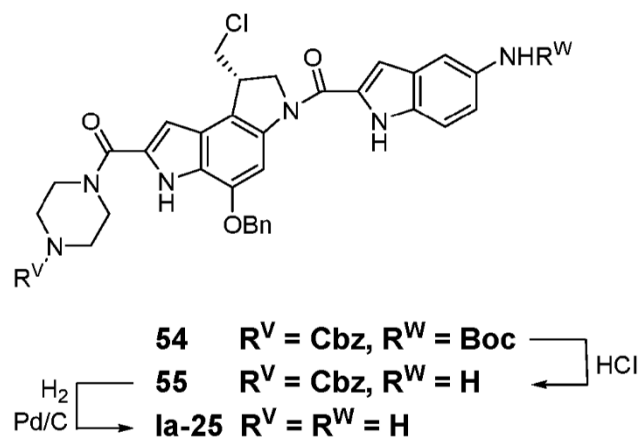
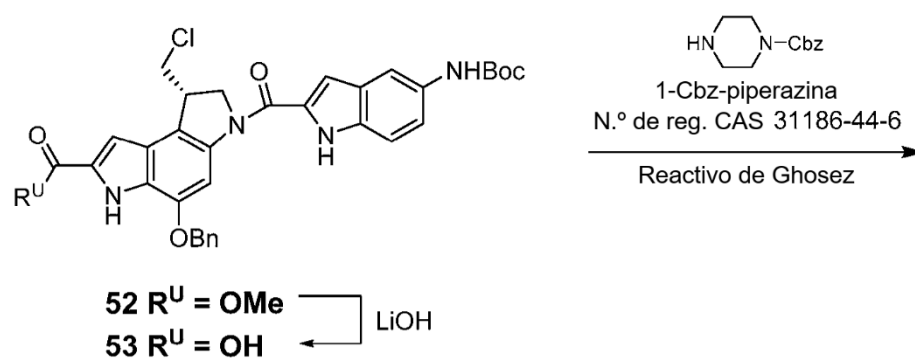
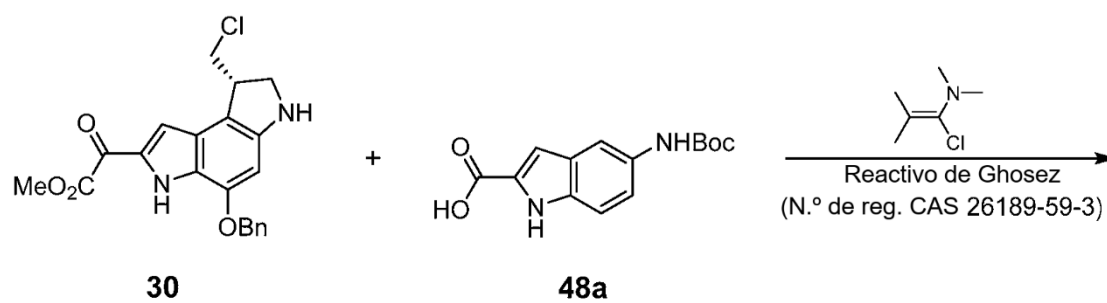
FIG. 10

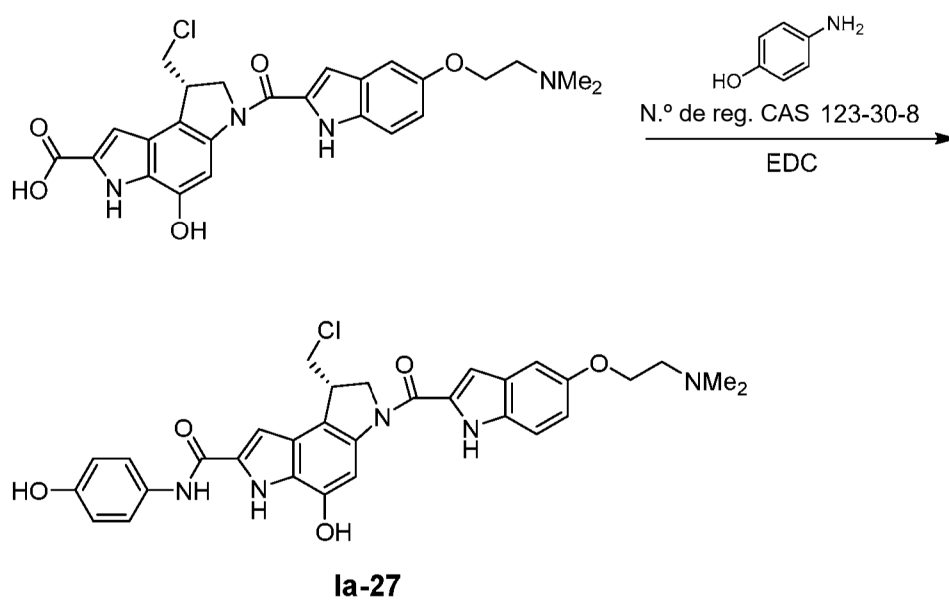
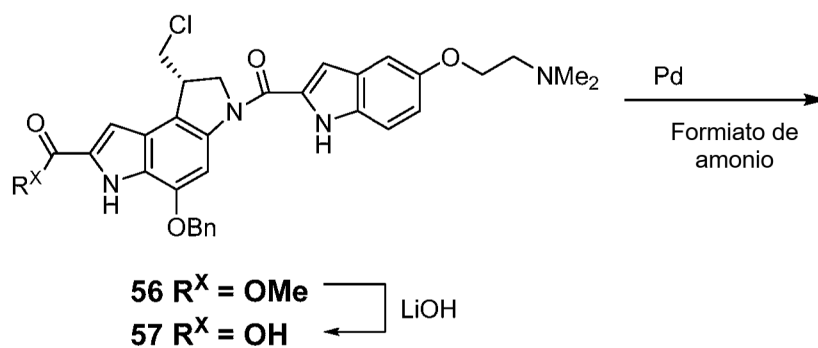
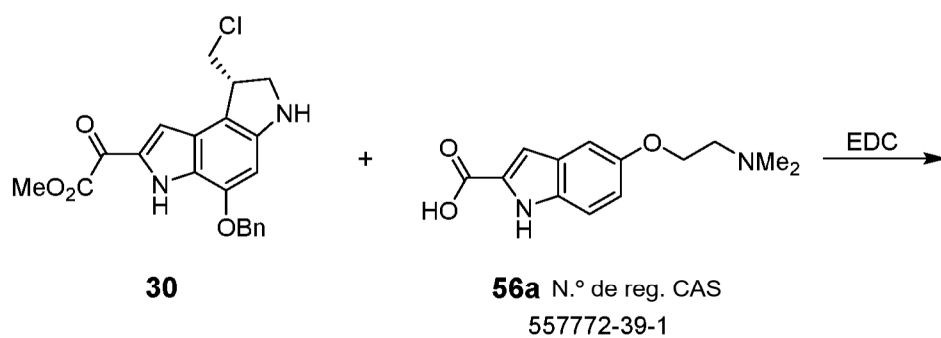
FIG. 11

FIG. 12