



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013020540-7 B1



(22) Data do Depósito: 15/02/2012

(45) Data de Concessão: 29/12/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS COMPREENDENDO AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA CONJUGADO A COMPOSTO CITOTÓXICO COM GRUPO LIGANTE

(51) Int.Cl.: C07K 16/30; A61K 31/5517; A61K 45/06; A61K 47/54; A61K 47/68; (...).

(52) CPC: C07K 16/30; A61K 31/5517; A61K 45/06; A61K 47/545; A61K 47/6803; (...).

(30) Prioridade Unionista: 06/05/2011 US 61/483,499; 15/02/2011 US 61/443,062; 15/02/2011 US 61/443,092.

(73) Titular(es): IMMUNOGEN, INC..

(72) Inventor(es): NATHAN FISHKIN; MICHAEL MILLER; WEI LI; RAJEEVA SINGH.

(86) Pedido PCT: PCT US2012025257 de 15/02/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/112687 de 23/08/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/08/2013

(57) Resumo: MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS COMPREENDENDO AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA CONJUGADO A COMPOSTO CITOTÓXICO COM GRUPO LIGANTE. A presente invenção é direcionada a métodos para preparar conjugados de um agente de ligação a célula (CBA) e um fármaco (tal como um composto citotóxico). Os métodos em questão compreendem o uso de um composto reativo de imina para permitir conjugações eficientes de compostos citotóxicos com agentes de ligação a célula.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS
COMPREENDENDO AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA CONJUGADO
A COMPOSTO CITOTÓXICO COM GRUPO LIGANTE".**

REFERÊNCIA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício da data de depósito de acordo com 35 U.S.C. §119(e), do Pedido Provisório US 61/443.062, depositado em 15 de fevereiro de 2011, Pedido Provisório US 61/483.499, depositado em 6 de maio de 2011, e Pedido Provisório US 61/443.092, depositado em 15 de fevereiro de 2011, os conteúdos completos dos quais, incluindo todos os desenhos, fórmulas, relatórios e reivindicações, são incorporados aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Esta invenção descreve o uso de reagentes reativos imina para a preparação de conjugados de agentes de ligação à célula com fármacos citotóxicos de ligação a DNA contendo um ou mais grupos funcionais imina.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] Anticorpos monoclonais estão sendo explorados de modo crescente como agentes terapêuticos contra câncer. Vários anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície celular já foram aprovados para tratamento de câncer, como rituximab para linfoma não Hodgkin, trastuzumab para câncer de mama, cetuximab para câncer de cabeça e pescoço e colorretal, cetuximab, panitimumab, e bevacizumab para câncer colorretal, e alemtuzumab para leucemia linfocítica crônica (Strome, S. E., Sausville, E. A., and Mann, D., 2007, *The Oncologist*, 12, 1084-1095). No entanto, a atividade citotóxica de um anticorpo "naked" pode ser limitada aos mecanismos de inibição da função de receptor, citotoxicidade dependente de complemento (CDC), e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC).

[0004] Uma abordagem para aumentar a atividade citotóxica de anticorpo para células de câncer-alvo é a ligação de anticorpo com efetores citotóxicos (A. D. Ricart, and A. W. Tolcher, 2007, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 4, 245-255; Lambert, J., 2010, *Drugs of the Future* 35, 471-480). O conjugado de anticorpo-fármaco citotóxica (ADC) se liga especificamente às células de câncer, seguido por internalização de conjugado e degradação, que resulta na liberação intracelular do fármaco tóxica e, por fim, à morte das células de câncer. As fármacos citotóxicos que foram empregadas em ligação com anticorpos incluem fármacos antitubulina como maitansinoides e auristatinas, fármacos de ligação ao DNA como calicheamicina que causa clivagem de DNA de fita dupla específica de sequência. Outra classe de fármacos citotóxicos de ligação ao DNA incluem pirrolobenzodiazepinas contendo imina (PBD) como N-2-imidazolil alquil substituído 1,2,5-benzotiadiazepina-1,1-dióxido, patente US 6.156.746), benzo-pirido ou dipirido tiadiazepina (WO 2004/069843), derivados de pirrolo [1,2-b] [1,2,5] benzotiadiazepinas e pirrol [1,2-b][1,2,5] benzodiazepina (WO2007/015280), derivados de tomaimicina (por exemplo, pirrolo[1,4]benzodiazepinas), como aqueles descritos em WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930, EP 2019104, e patente US 6.156.746). Outras fármacos benzodiazepina de ligação ao DNA são descritas na publicação de patente US 2010/0203007A1. Estas fármacos benzodiazepinas contendo ligações imina ligadas ao sulco menor de DNA e interferem com a função de DNA, resultando em morte celular.

[0005] Há uma necessidade para novos métodos para preparar conjugados de agente de ligação à célula e fármacos citotóxicos contendo um grupo imina.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

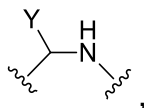
[0006] A presente invenção descreve o uso de reagentes reativos

de imina para tratar um fármaco contendo imina, que resultou em uma melhora inesperada em sua reação de conjugação com agentes de ligação à célula (CBA) como anticorpos. Os reagentes são tais que as propriedades de ligação à célula do fármaco não são diminuídas e a integridade do CBA (anticorpo) é totalmente mantida.

[0007] Em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir um composto citotóxico com um CBA modificado em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, em que:

a) o CBA modificado compreende um resíduo de um agente de ligação cruzada bifuncional ligado ao CBA, e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo tiol; e

b) o composto citotóxico compreende um grupo tiol, e um grupo representado por:



em que:

[0008] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou

ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, and $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila.

[0009] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico é produzido reagindo um composto citotóxico contendo imina contendo o grupo tiol com um reagente reativo imina.

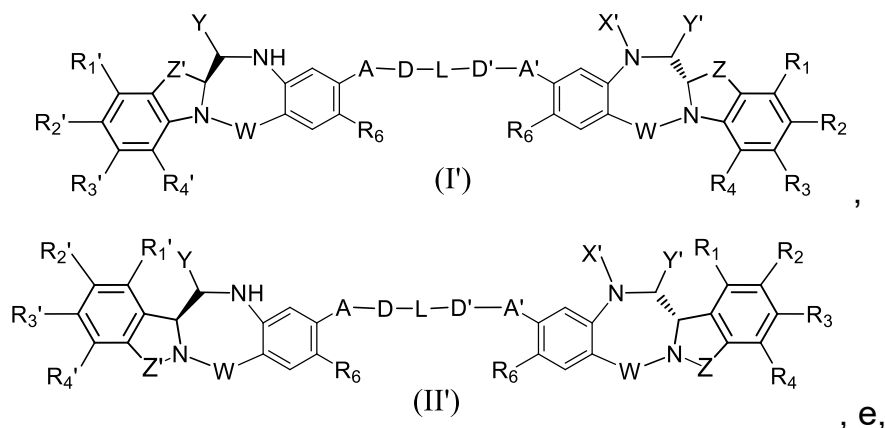
[00010] Em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir o CBA com um composto citotóxico contendo imina, um reagente reativo imina, e um agente de ligação cruzada bifuncional compreendendo o grupo de ligação para formar o conjugado.

[00011] Em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo:

a) reagir um composto citotóxico com um agente de ligação cruzada bifuncional compreendendo o grupo de ligação, um grupo reativo com o CBA (como um grupo tiol, um grupo maleimido, um grupo haloacetamida, ou um grupo amina), e um grupo reativo com o composto citotóxico, para formar um composto citotóxico modificado covalentemente ligado a um resíduo do agente de ligação cruzada bifuncional, em que o resíduo compreende o grupo de ligação e o grupo reativo com o CBA;

[00012] em que o composto citotóxico é representado por uma das

seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



em que:

[00013] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^j pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila;

[00014] X' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo de proteção amina, uma

alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00015] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[00016] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[00017] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

[00018] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear,

ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00019] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-NR_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00020] n é um inteiro de 1 a 24;

[00021] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2 , BH, SO e SO_2 ;

[00022] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, $-NR'R''$, $-NO_2$, ou, halogênio;

[00023] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$;

[00024] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00025] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00026] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila

linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

[00027] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $-N(R_5)-$ e $-CRR'N(R_5)-$,

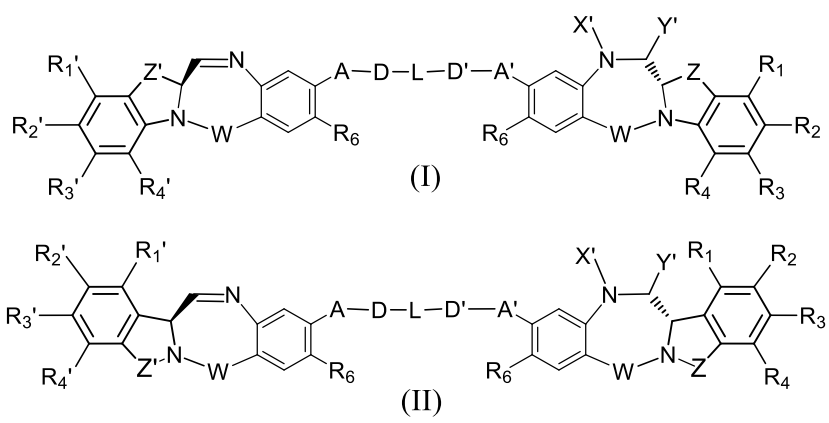
[00028] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00029] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

[00030] L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, ou é uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída; e,

b) reagir o composto citotóxico modificado com o CBA através do grupo reativo com o CBA, em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, para formar o conjugado.

[00031] Em qualquer uma das modalidades acima, o composto citotóxico contendo imina pode ser representado por qualquer uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



em que:

[00032] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00033] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[00034] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[00035] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma

alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$, halogênio, guanidínio $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, $-\text{OR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NCO}$, $-\text{NR}'\text{COR}''$, $-\text{SR}$, um sulfóxido representado por $-\text{SOR}'$, uma sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, um sulfonato $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$, um sulfato $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$, uma sulfonamida representada por $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, ciano, um azido, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$, $-\text{OCONR}'\text{R}''$ e o grupo de ligação;

[00036] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em $-\text{H}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00037] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{COR}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00038] n é um inteiro de 1 a 24;

[00039] W é selecionado de $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, CH_2 , BH , SO e SO_2 ;

[00040] R_6 é $-\text{H}$, $-\text{R}$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, ou halogênio;

[00041] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2)_{n_a'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-NR}_9\text{-(CH}_2)_{n_a'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-O-(CH}_2)_{n_a'}\text{-}$ e -

$(\text{CH}_2)_n\text{--S--}(\text{CH}_2)_{n'a}\text{--}$;

[00042] n' e $n'a$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00043] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{--}$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00044] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{--}$;

[00045] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-\text{C}(=\text{O})-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- e -CRR'N(R_5)-,

[00046] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00047] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{--}$;

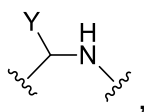
[00048] L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, e é uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{--}$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila,

alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída.

[00049] Ainda em outra modalidade, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir um composto citotóxico modificado com o CBA em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, caracterizado pelo fato de que o composto citotóxico modificado compreende:

a) um resíduo de um agente de ligação cruzada bifuncional ligado ao segundo composto citotóxico, e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo selecionado de um éster reativo e um grupo reativo tiol, e,

b) um grupo representado por:



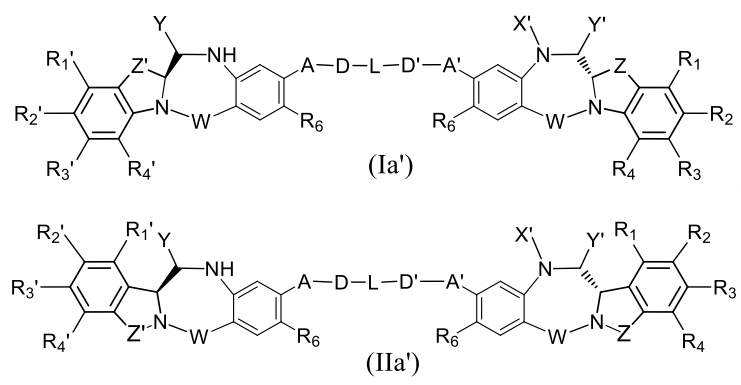
em que:

[00050] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiosulfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiosulfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo

menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, and $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterocíclica ou heteroarila.

[00051] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico modificado é produzido reagindo um reagente reativo imina com um composto citotóxico contendo imina contendo o grupo de ligação e o grupo reativo.

[00052] Em qualquer uma das modalidades acima, o composto citotóxico modificado é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[00053] Y é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $PO_2S_2H_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $PO_2S_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iS- , R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($P(=S)(OR^{k'})$ (S)(OH) ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^{k'}C(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou

um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila;

[00054] X' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00055] Y' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo oxo, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[00056] R^c é $-\text{H}$ ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de

ligação com o grupo reativo ligado a este;

[00057] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'', e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[00058] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00059] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00060] n é um inteiro de 1 a 24;

[00061] W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

[00062] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halogênio ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[00063] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ - e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ -;

[00064] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00065] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$ -, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00066] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$ -;

[00067] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ and -CRR'N(R₅)-;

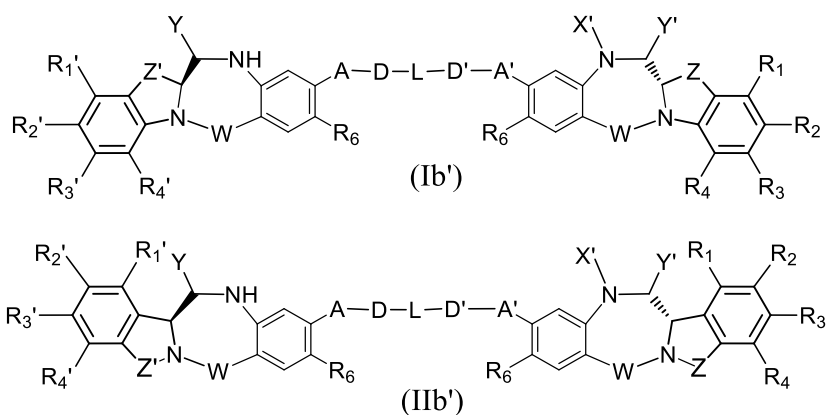
[00068] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[00069] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$ -;

[00070] L é ausente, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$ -, uma alquila ou

alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que o alquila ou alquenila é opcionalmente substituída por o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; fenila ou anel heterocíclico ou heteroaril pode ser opcionalmente substituído, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[00071] Em qualquer uma das modalidades acima, o composto citotóxico e o grupo de ligação do conjugado é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[00072] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$

Na⁺) ou uma mistura dos mesmos, em que Rⁱ é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de -N(R^j)₂, -CO₂H, -SO₃H, and -PO₃H; Rⁱ pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; R^{k'} é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterocíclica ou heteroarila;

[00073] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00074] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[00075] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação;

[00076] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' e R₄' são cada um

independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$, halogênio, guanidínio $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação;

[00077] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável, como Na⁺;

[00078] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00079] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[00080] n é um inteiro de 1 a 24;

[00081] W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

[00082] R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halogênio ou o grupo

de ligação;

[00083] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$;

[00084] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[00085] R₇ e R₈ são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[00086] R₉ é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$;

[00087] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅)- e -CRR'N(R₅)-,

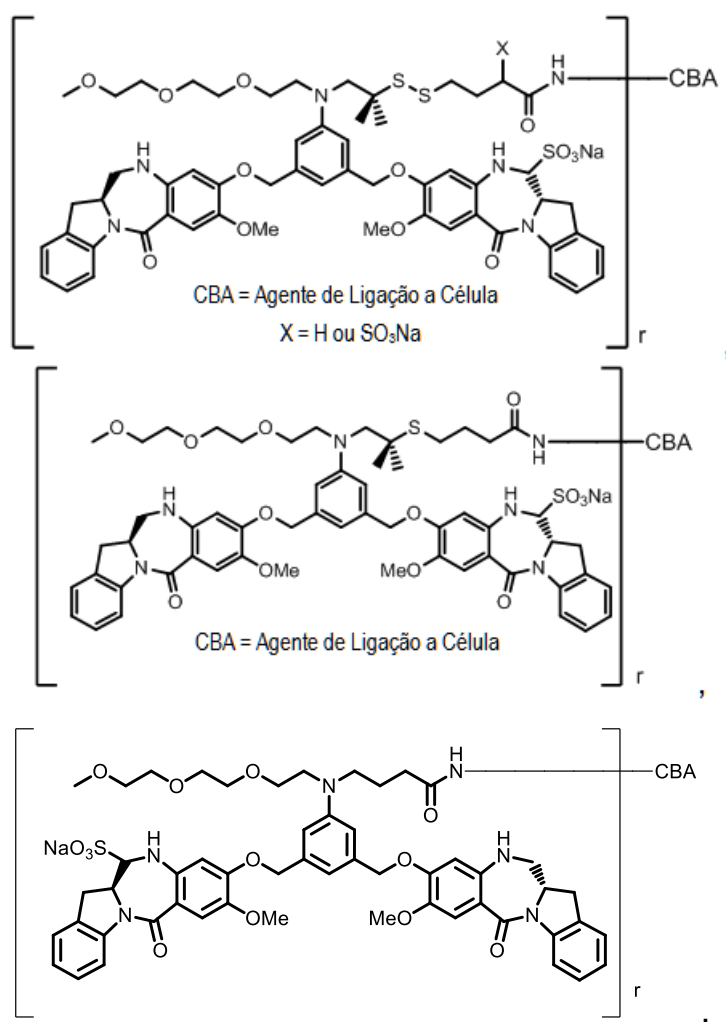
[00088] R₅ para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

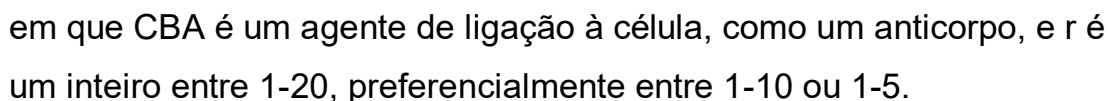
[00089] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$;

[00090] L é ausente, o grupo de ligação, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída ou alquenil contendo 1 a 10 átomos de

carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que o alquila ou alquenila é opcionalmente substituída por o grupo de ligação; fenila ou anel heterocíclico ou heteroaril pode ser opcionalmente substituído, em que o substituinte pode compreender o grupo de ligação.

[00091] Vários conjugados preferenciais que podem ser produzidos de acordo com qualquer um dos métodos da invenção incluem:





BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00094] A FIG. 2 mostra citotoxicidade semelhante in vitro de conjugados HuMy9-6-Fármaco 2 preparados sem e com bissulfito de sódio contra células HL60 que expressam antígeno CD33.

[00095] A FIG. 3 mostra citotoxicidade semelhante in vitro de conjugados anti-CD22 Ab-Fármaco 2 preparados sem e com bissulfito de sódio contra células BJAB que expressam CD22.

[00096] A FIG. 4 mostra análise de HPLC de fase reversa do fármaco 2 e fármaco 2 tratada com bissulfito de sódio.

[00097] A FIG. 5 amostra análise MS de huMy9-6-SPDB-fármaco 1 desglicosilado preparado como e sem bissulfito de sódio usando 7 equivalentes molares de 1 por anticorpo. A) Conjugado preparado sem bissulfito de sódio com média 1,4 fármaco 1/Ab e espécie de anticorpo com até três moléculas de fármaco 1 ligadas. B) Conjugado preparado com bissulfito de sódio com média de 2,5 1/Ab e espécie de anticorpo com até sete moléculas do fármaco 1 ligadas.

[00098] A FIG. 6 mostra aquela adição de reação de conjugação de bissulfito de sódio do fármaco 1 não resultou em fragmentação de anticorpo (SDS-PAGE não redutor; análise de chip gel).

[00099] As FIGs. 7-11 mostram métodos exemplares da presente invenção para preparar um conjugado de agente-fármaco de ligação à célula.

[000100] A FIG. 12 mostra análise de espectrometria de massa (MS) de My9-6-SPDB-1 desglicosilado preparado por conjugação de um éster NHS contendo composto 1 (método reagente de uma etapa) diretamente às lisinas de anticorpo, ou conjugando anticorpo 1d a um anticorpo modificada por ditiopiridina (método de duas etapas).

[000101] A FIG. 13 mostra dados de MS para My9-6-sulfo-SPDB-1 preparados usando um método de duas etapas em diferentes condições de pH. O tempo de reação aumentada parece estar correlacionado com citotoxicidade *in vitro* independente de antígeno CD33 aumentada em células HL60-QC pré-tratadas com 1 μ M huMy9-6 não conjugado. Morte dependente de antígeno para todos os conjugados foi semelhantemente alto (~ 4 pM IC₅₀). Tempo de reação curto (1-3 h) é preferencial para minimizar fragmentação de anticorpo e morte de célula não específica *in vitro* por My9-6-sulfo-SPDB-1.

[000102] A FIG. 14 mostra dados de MS para chKTI-sulfo-SPDB-1 preparados usando um método de duas etapas com relações diferentes de composto 1d/ligante.

[000103] A FIG. 15 mostra o uso de reagentes imina covalentes para melhorar especificações de conjugado Ab-fármaco (% de monômero e carga de fármaco).

[000104] A FIG. 16 mostra o esquema para a síntese de duas etapas dos conjugados anticorpo-fármaco representativos.

[000105] A FIG. 17 mostra a citotoxicidade *in vitro* e especificidade dos conjugados huMy9-6-SPDB-1f contra várias linhagens celulares. Notar que o bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000106] A FIG. 18 mostra conjugação de dímero não reduz a afinidade de ligação do anticorpo. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000107] A FIG. 19 mostra atividade antitumoral *in vivo* de conjugado huMy9-6. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000108] A FIG. 20 mostra citotoxicidade *in vitro* de conjugado huMy9-6-SPDB-1f contra células positivas para antígeno. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000109] A FIG. 21 mostra citotoxicidade *in vitro* para huMy9-6-SPDB-1f (A), huMy9-6-sulfoSPDB-1f (B) e huMy9-6-BMPS-1f (C) contra células HL60/QC (Ag^+) com e sem bloqueio de sítios de ligação de antígeno. Notar que em todos os três experimentos (34A, 34B, e 34C), bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000110] A FIG. 22 mostra citotoxicidade *in vitro* para chB38,1-SPDB-1f (A), e chB38,1-sulfoSPDB-1f (B) contra células COLO205 (Ag^+). Notar que em ambos os experimentos, bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000111] A FIG. 23 mostra eficácia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-1f em

camundongos contendo HL60/QC. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação.

[000112] A FIG. 24 mostra atividade antiproliferativa comparando (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-sulfoSPDB-1f, e (C) huMy9-6-BMPS-1f, contra células OCI-AML3 (Ag^+) com e sem bloqueio de sítios de ligação de antígeno. Notar que em todos os três experimentos, bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000113] A FIG. 25 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-BMPS-1f em camundongos contendo tumor MOLM-13. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000114] A FIG. 26 mostra um esquema de síntese representativa para um conjugado de Folato sulfonatado/composto citotóxico. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000115] A FIG. 27 mostra eficácia in vivo de huMy9-6-fármaco 2 em camundongos contendo tumor MOLM-13. Notar que bissulfito de sódio foi adicionado à reação de conjugação para preparar o conjugado.

[000116] A FIG. 28 mostra a preparação de huMy9-6-sulfo-SPDB-1d usando o ligante altamente reativo 4-nitroPy-sulfo-SPDB.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[000117] A referência agora será feita em detalhe a determinadas modalidades da invenção, exemplos dos quais são ilustrados nas estruturas e fórmulas de que acompanham. Enquanto a invenção será descrita em conjunto com as modalidades numeradas, será entendido que não pretendem se limitar à invenção àquelas modalidades. Do contrário, a invenção pretende cobrir todas as alternativas, modificações, e equivalentes que podem ser incluídos dentro do escopo da presente invenção como definido pelas reivindicações. Um especialista na técnica reconhecerá muitos métodos e materiais

semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui, que poderiam ser usados na prática da presente invenção.

[000118] Deve ser entendido que qualquer uma das modalidades descritas aqui, incluindo aquelas descritas em diferentes aspectos da invenção (por exemplo, compostos, moléculas ligantes ao composto, conjugados, composições, métodos de preparo e uso) e diferentes partes da especificação (incluindo modalidades descritas somente nos Exemplos) pode ser combinadas com uma ou mais outras modalidades da invenção, salvo se explicitamente rejeitado ou impróprio. A combinação das modalidades não é limitada às aquelas combinações específicas reivindicadas através das várias reivindicações dependentes.

Definições

[000119] **"Alquila linear ou ramificada"** como usado aqui refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente de cadeia saturada linear ou ramificada de um a vinte átomos de carbono. Exemplos de alquil incluem, entre outros, metila, etila, 1-propila, 2-propila, 1-butila, 2-metil-1-propila, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-butila, 2-metil-2-propila, 1-pentila, 2-pentil-3-pentila, 2-metil-2-butila, 3-metil-2-butila, 3-metil-1-butila, 2-metil-1-butila, 1-hexila, 2-hexila, 3-hexila, 2-metil-2-pentila, 3-metil-2-pentila, 4-metil-2-pentila, 3-metil-3-pentila, 2-metil-3-pentila, 2,3-dimetil-2-butila, 3,3-dimetil-2-butila, 1-heptila, 1-octila, e semelhantes. Preferencialmente, o alquil tem um a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, o alquil tem um a quatro átomos de carbono.

[000120] **"Alquenila linear ou ramificada"** refere-se a radical hidrocarboneto monovalente de cadeia linear ou ramificada de dois a vinte átomos de carbono com pelo menos um local de insaturação, ou seja, uma ligação dupla de carbono-carbono, em que o radical alquenil inclui radicais contendo orientações "cis" e "trans", ou alternativamente, orientações "E" e "Z". Exemplos incluem, entre outros, etilenila ou vinil

(-CH=CH₂), alil (-CH₂CH=CH₂), e semelhantes. Preferencialmente, o alquenil tem dois a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, o alquil tem dois a quatro átomos de carbono.

[000121] **"Alquinila linear ou ramificada"** refere-se a um radical hidrocarboneto monovalente linear ou ramificado de dois a vinte átomos de carbono com pelo menos um local de insaturação, ou seja, uma ligação tripla carbono-carbono. Exemplos incluem, entre outros, etinila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-pentinila, hexinila, e semelhantes. Preferencialmente, o alquinil tem dois a dez átomos de carbono. Mais preferencialmente, o alquinil tem dois a quatro átomos de carbono.

[000122] O termo **"carbociclo," "carbociclila" e "anel carbocíclico"** referem-se a um anel monovalente não saturado, saturado ou parcialmente insaturado contendo 3 a 12 átomos de carbono como um anel monocíclico ou 7 a 12 átomos de carbono como um anel bicíclico. Carbociclos bicíclicos contendo 7 a 12 átomos podem ser arranjados, por exemplo, como um sistema biciclo [4.5], [5.5], [5.6], ou [6.6], e carbociclos bicíclicos contendo 9 ou 10 átomos no anel podem ser arranjados como um sistema biciclo [5.6] ou [6.6], ou como sistemas em ponte como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano e biciclo[3.2.2]nonano. Exemplos de carbociclos monocíclicos incluem, entre outros, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, 1-ciclopent-1-enila, 1-ciclopent-2-enila, 1-ciclopent-3-enila, ciclohexila, 1-ciclohex-1-enila, 1-ciclohex-2-enila, 1-ciclohex-3-enila, ciclohexadienila, cicloheptila, ciclooctila, ciclonoila, ciclodecila, cicloundecila, ciclododecila, e semelhantes.

[000123] Os termos **"alquila cíclica" e "cicloalquila"** podem ser usados de modo intercambiável. Referem-se a um radical monovalente anel carbocíclico saturado. Preferencialmente, o alquil cíclico é radical de anel monocíclico de 3 a 7 membros. Mais preferencialmente, o alquil

cíclico é ciclohexila.

[000124] O termo "**alquenila cíclica**" refere-se a um radical anel carbocíclico contendo pelo menos uma ligação dupla na estrutura em anel.

[000125] O termo "**alquinila cíclica**" refere-se a um radical carbocíclico contendo pelo menos uma ligação tripla na estrutura em anel.

[000126] "Arila" significa um radical hidrocarboneto aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivado pela remoção de um átomo de hidrogênio a partir de um único átomo de carbono de um sistema em anel aromático parente. Alguns grupos arila são representados nas estruturas exemplares como "Ar." Aril inclui radicais bicíclicos compreendendo um anel aromático fundido a um anel heterocíclico ou carbocíclico aromático saturado, parcialmente insaturado. Grupos aril típicos incluem, entre outros, radicais derivados de benzeno (fenila), benzenos substituídos, naftaleno, antraceno, indenila, indanila, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftila, e semelhantes. Preferencialmente, arila é grupo fenila.

[000127] Os termos "**heterociclo**," "**heterociclila**," e "**anel heterocíclico**" são usados aqui de modo intercambiável e referem-se a um radical carbocíclicos saturado ou parcialmente insaturado (ou seja, contendo uma ou mais duplas e/ou triplas ligações dentro do anel) de 3 a 18 átomos no anel em que pelo menos um átomo no anel é um heteroátomo selecionado de nitrogênio, oxigênio, fósforo, e enxofre, os demais átomos no anel sendo C, onde um ou mais átomos no anel é opcionalmente substituído independentemente com um ou mais substituintes descritos abaixo. Um heterociclo pode ser um monociclo contendo 3 a 7 membros no anel (2 a 6 átomos de carbono e 1 a 4 heteroátomos selecionados de N, O, P, e S) ou um biciclo contendo 7 a 10 membros no anel (4 a 9 átomos de carbono e 1 a 6 heteroátomos

selecionados de N, O, P, e S), por exemplo: um sistema biciclo [4.5], [5.5], [5.6], ou [6.6]. Heterociclos são descritos em Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, e 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 até o presente), em particular Volumes 13, 14, 16, 19, e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. **"Heterociclila"** ainda inclui radicais onde os radicais heterociclos são fundidos com um anel saturado, parcialmente insaturado, ou carbocíclico aromático ou anel heterocíclico. Exemplos de anéis heterocíclicos incluem, entre outros, pirrolidinila, tetrahydrofuranila, dihydrofuranila, tetrahydrotienila, tetrahydropyranila, dihydropyranila, tetrahydrothiopyranila, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanila, piperazinila, homopiperazinila, azetidinila, oxetanila, tietanila, homopiperidinila, oxepanila, tiepanila, oxazepinila, diazepinila, tiazepinila, 2-pyrroline, 3-pyrroline, indoline, 2H-pyran, 4H-pyran, dioxanila, 1,3-dioxolanila, pirazolinila, dithianila, dithiolanila, dihydropyranila, dihydrotienila, dihydrofuranila, pirazolidinylimidazolinila, imidazolidinila, 3-azabicyclo[3,1,0]hexanila, 3-azabicyclo[4,1,0]heptanila, e azabicyclo[2,2,2]hexanila. Porções espiro são ainda incluídos dentro do escopo desta definição. Exemplos de um grupo heterocíclico em que átomos no anel são substituídos por porções oxo (=O) são pirimidinonila e 1,1-dioxo-tiomorfolinila.

[000128] O termo **"heteroarila"** refere-se a um radical aromático monovalente de 5 ou 6 membros no anel, e inclui sistemas de anel fundido (pelo menos um dos quais é aromático) de 5-18 átomos, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre. Exemplos de grupos heteroarila são piridinil (incluindo, por exemplo, 2-hidroxipiridinila), imidazolila, imidazopyridinila, pirimidinil (incluindo, por exemplo, 4-hidroxipirimidinila), pirazolila, triazolila, pirazinila, tetrazolila, furila,

tienila, isoxazolila, tiazolila, oxazolila, isotiazolila, pirrolila, quinolinila, isoquinolinila, indolila, benzimidazolila, benzofuranila, cinnolinila, indazolila, indolizinila, ftalazinila, piridazinila, triazinila, isoindolila, pteridinila, purinila, oxadiazolila, triazolila, tiadiazolila, furazanila, benzofurazanila, benzotiofenila, benzotiazolila, benzoxazolila, quinazolinila, quinoxalinila, naftiridinila, e furopiridinila.

[000129] O heterociclo ou grupos heteroarila podem ser carbono (ligado ao carbono) ou nitrogênio (ligado ao nitrogênio) ligado onde é possível. Por meio de exemplo e não limitação, carbono ligado aos heterociclos ou heteroarila é ligado na posição 2, 3, 4, 5, ou 6 de uma piridina, posição 3, 4, 5, ou 6 de uma piridazina, posição 2, 4, 5, ou 6 de uma pirimidina, posição 2, 3, 5, ou 6 de uma pirazina, posição 2, 3, 4, ou 5 de um furano, tetrahydrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol ou tetrahidropirrol, posição 2, 4, ou 5 de um oxazol, imidazol ou tiazol, posição 3, 4, ou 5 de um isoxazol, pirazol, ou isotiazol, posição 2 ou 3 de uma aziridina, posição 2, 3, ou 4 de uma azetidina, posição 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma quinolina ou posição 1, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 de uma isoquinolina.

[000130] Por meio de exemplo e não limitação, nitrogênio ligado aos heterociclos ou heteroarila são ligados na posição 1 de uma aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posição 2 de um isoindol, ou isoindolina, posição 4 de uma morfolina, e posição 9 de um carbazol, ou O-carbolina.

[000131] Os heteroátomos presentes em heteroarila ou heterociclil incluem as formas oxidadas como NO, SO, e SO₂.

[000132] O termo "**halo**" ou "**halogênio**" refere-se a F, Cl, Br ou I.

[000133] A alquila, alquenila, alquinila, alquila cíclica, alquenila cíclica, alquinila cíclica, carbociclila, arila, heterociclila e heteroarila deila

descritas acima podem ser opcionalmente substituídas por um ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou more) substituintes.

[000134] Se um substituinte é descrito como sendo "**substituído**," um substituinte não hidrogênio está no lugar de um substituinte hidrogênio em um carbono, oxigênio, enxofre ou nitrogênio do substituinte. Assim, por exemplo, um substituinte alquil substituído é um substituinte alquila em que pelo menos um substituinte não hidrogênio está no lugar de um substituinte hidrogênio no substituinte alquila. Para ilustrar, monofluoralquila é alquil substituído por um substituinte fluor, e difluoralquila é alquil substituído por dois substituintes fluor. Deve ser reconhecido que se há mais do que uma substituição em um substituinte, cada substituinte não hidrogênio pode ser idêntico ou diferente (salvo se declarado de outra forma).

[000135] Se um substituinte é descrito como sendo "**opcionalmente substituído**," o substituinte pode ser (1) não substituído, ou (2) substituído. Se um carbono de um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído por uma ou mais de uma lista de substituintes, um ou mais dos hidrogênios no carbono (na medida em que há algum) pode separadamente e/ou junto ser substituído por um substituinte opcional independentemente selecionado. Se um nitrogênio de um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído por uma ou mais de uma lista de substituintes, um ou mais dos hidrogênios no nitrogênio (na medida em que há algum) pode cada ser substituído por um substituinte opcional independentemente selecionado. Um substituinte exemplar pode ser descrito como -NR'R", em que R' e R" junto com o átomo de nitrogênio ao qual são ligados, podem formar um anel heterocíclico. O anel heterocíclico formado de R' e R" junto com o átomo de nitrogênio ao qual são ligados podem ser parcialmente ou totalmente saturado. Em uma modalidade, o anel heterocíclico consiste de 3 a 7 átomos. Em outra modalidade, o anel heterocíclico é

selecionado do grupo que consiste em pirrolila, imidazolila, pirazolila, triazolila, tetrazolila, isoxazolila, piridila e tiazolila.

[000136] Este relatório usa os termos "**substituente**," "**radical**," e "**grupo**" de modo intercambiável.

[000137] Se um grupo de substituintes é coletivamente descrito como sendo opcionalmente substituído por um ou mais de uma lista de substituintes, o grupo pode incluir: (1) substituintes não substituíveis, (2) substituintes substituíveis que não são substituídos pelos substituintes opcionais, e/ou (3) substituintes substituíveis que são substituídos por um ou mais dos substituintes opcionais.

[000138] Se um substituinte é descrito como sendo opcionalmente substituído por até um número particular de substituintes não hidrogênios, aquele substituinte pode ser (1) não substituído; ou (2) substituído por até aquele número particular de substituintes não hidrogênios ou por até o número máximo de posições substituíveis no substituinte, o que for menor. Assim, por exemplo, se um substituinte é descrito como um heteroarila opcionalmente substituída por até 3 substituintes não hidrogênios, então qualquer heteroaril com menos do que 3 posições substituíveis poderia ser opcionalmente substituído por até quantos substituintes não hidrogênios quanto o heteroaril tiver posições substituíveis. Ditos substituintes, em exemplos não limitantes, podem ser selecionados de uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila, heterociclila, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, um sulfóxido representado por $-SOR^{101}$, uma sulfona representada por $-SO_2R^{101}$, um sulfonato $-SO_3M$, um sulfato $-OSO_3M$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, um azido, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ e uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ em que M é H ou um cátion farmacologicamente aceitável (como Na^+ ou K^+);

R^{101} , R^{102} e R^{103} são cada um independentemente selecionados de H, linear, ramificado ou alquila cíclica, alquenila ou alquinil contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n-$ R^{104} , em que n é um inteiro de 1 a 24, um aril contendo de 6 a 10 átomos de carbono, um anel heterocíclico contendo de 3 a 10 átomos de carbono e um heteroaril contendo 5 a 10 átomos de carbono; e R^{104} é H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, em que a alquila, alquenila, alquinila, arila, heteroarila e heterociclil nos grupos representado por R^{100} , R^{101} , R^{102} , R^{103} e R^{104} são opcionalmente substituídos por uma ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) substituintes independentemente selecionados de halogênio, -OH, -CN, -NO₂ e alquil não substituído linear ou ramificado contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, os substituintes para a alquila, alquenila, alquinila, alquila cíclica, alquenila cíclica, alquinila cíclica, carbociclila, arila, heterociclila e heteroarila opcionalmente substituídas descritos acima incluem halogênio, -CN, -NR¹⁰²R¹⁰³, -CF₃, -OR¹⁰¹, arila, heteroarila, heterociclila, -SR¹⁰¹, -SOR¹⁰¹, -SO₂R¹⁰¹ e -SO₃M.

[000139] O termo "**composto**" ou "**composto citotóxico**," "**dímero citotóxico**" e "**composto dímero citotóxico**" são usados de modo intercambiável. É pretendido incluir compostos para os quais uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado biologicamente ativo do mesmo foi revelado na presente invenção ou uma estrutura ou fórmula ou qualquer derivado do mesmo que foi incorporado por referência. O termo ainda inclui, estereoisômeros, isômeros geométricos, tautômeros, solvatos, metabólitos, sais (por exemplo, sais farmacologicamente aceitáveis) e profármacos, e sais profármacos de um composto de todas as fórmulas reveladas na presente invenção. O termo ainda inclui qualquer solvatos, hidratos, e polimorfos de qualquer um dos anteriores. A menção específica de "estereoisômeros," "isômeros geométricos," "tautômeros," "solvatos," "metabólitos," "sal" "profármaco," "sal de

profármaco," "conjugados," "sais conjugados," "solvato," "hidrato," ou "polimorfo" em certos aspectos da invenção descrita neste pedido não deve ser interpretado como uma omissão pretendida destas formas em outros aspectos da invenção onde o termo "composto" é usado sem menção destas outras formas. Em uma modalidade, composto citotóxico compreende um grupo ligante ou um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este. Alternativamente, composto citotóxico não compreende um grupo ligante ou um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este.

[000140] O termo "**conjugado**" como usado aqui refere-se a um composto descrito aqui ou um derivado do mesmo que é ligado a um agente de ligação à célula.

[000141] O termo "**ligável a um agente de ligação à célula**" como usado aqui refere-se aos compostos descritos aqui ou derivados dos mesmos compreendendo pelo menos um grupo ligante ou um precursor do mesmo apropriado para ligar estes compostos ou derivados do mesmo a um agente de ligação à célula.

[000142] O termo "**precursor**" de um determinado grupo refere-se a qualquer grupo que pode levar àquele grupo por qualquer reação de desproteção, uma modificação química ou um acoplamento.

[000143] O termo "**ligado a um agente de ligação à célula**" refere-se a uma molécula de conjugado compreendendo pelo menos um dos compostos descritos aqui (por exemplo, compostos e compostos de fármaco-ligante descritos aqui), ou derivado do mesmo ligado a um agente de ligação à célula através de um grupo ligante apropriado ou um precursor do mesmo.

[000144] O termo "**quiral**" refere-se às moléculas que têm a propriedade de não sobreposição do parceiro de imagem especular, enquanto o termo "aquiral" refere-se às moléculas que são sobrepostas em seus parceiros de imagem especular.

[000145] O termo "**estereoisômero**" refere-se aos compostos que têm constituição química idêntica e conectividade, mas orientações diferentes de seus átomos no espaço que não pode ser interconvertido por rotação ao redor de ligações simples.

[000146] "**Diastereoisômero**" refere-se a um estereoisômero com dois ou mais centros de quiralidade e cujas moléculas não são imagens especulares de outro. Diastereoisômeros têm diferentes propriedades físicas, por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, propriedades espectrais, e reatividades. As misturas de diastereoisômeros podem se separar em procedimentos analíticos de alta resolução como cristalização, eletroforese e cromatografia.

[000147] "**Enantiômeros**" referem-se a dois estereoisômeros de um composto que não são imagens especulares sobrepostas de um outro.

[000148] Definições estereoquímicas e convenções usadas aqui geralmente seguem S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; e Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Os compostos da invenção podem conter centros quirais ou assimétricos, e, portanto, existem em diferentes formas estereoisoméricas. É pretendido que todas as formas estereoisoméricas dos compostos da invenção, incluindo, entre outros, diastereoisômeros, enantiômeros e atropisômeros, bem como misturas dos mesmos como misturas racêmicas, formam parte da presente invenção. Muitos compostos orgânicos existem em formas opticamente ativas, ou seja, têm a capacidade de girar o plano de luz polarizada. Ao descrever um composto opticamente ativo, os prefixos D e L, ou R e S, são usados para denotar a configuração absoluta da molécula ao redor de seu centro quiral. Os prefixos d e l ou (+) e (-) são empregados para designar o sinal de rotação de plano de luz polarizada pelo composto, com (-) ou l significando que o composto é levorrotatório. Um composto

prefixado com (+) ou d é dextrorotatório. Para determinada estrutura química, estes estereoisômeros são idênticos exceto que são imagens especulares de outro. Um estereoisômero específico pode ainda ser referenciado como um enantiômero, e uma mistura de ditos isômeros é geralmente chamada de mistura enantiomérica. Uma mistura 50:50 de enantiômeros é referenciada como uma mistura racêmica ou racemato, que pode ocorrer onde não há estereoseleção ou estereoespecificidade em uma reação ou processo químico. Os termos "mistura racêmica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, destituído de atividade óptica.

[000149] O termo "**tautômero**" ou "**forma tautomérica**" refere-se a isômeros estruturais de diferentes energias que são interconvertíveis através de uma barreira de energia baixa. Por exemplo, tautômeros de próton (também chamado de tautômeros prototrópicos) incluem interconversões através de migração de um próton, como isomerizações ceto-enol e imina-enamina. Tautômero de valência incluem interconversões por reorganização de alguns dos elétrons da ligação.

[000150] O termo "**profármaco**" como usado neste pedido refere-se a um precursor ou derivado da forma de um composto da invenção que é capaz de ser enzimaticamente ou hidroliticamente ativada ou convertida na forma parente mais ativa. Ver, por exemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). As profármacos desta invenção incluem, entre outros, profármacos contendo éster, profármacos contendo fosfato, profármacos contendo tiofosfato, profármacos contendo sulfato, profármacos contendo peptídeo, profármacos contendo D-aminoácido modificado, profármacos

contendo glicosiladas, profármacos contendo β -lactama, profármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída, profármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituído, profármacos de 5-fluorocitosina e outra 5-fluoruridina que podem ser convertido na fármaco livre ativa mais citotóxica. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem então ser derivatizados em uma forma de profármaco para uso nesta invenção incluem, entre outros, compostos da invenção e agentes quimioterápicos como descrito acima.

[000151] O termo "**profármaco**" ainda pretende incluir um derivado de um composto que pode hidrolisar, oxidar, ou de outra forma reagir em condições biológicas (*in vitro* ou *in vivo*) para fornecer um composto desta invenção. Profármacos podem somente se tornar ativas em dita reação em condições biológicas, ou podem ter atividade em suas formas não reagidas. Exemplos de profármacos contempladas nesta invenção incluem, entre outros, análogos ou derivados de compostos de qualquer uma das fórmulas reveladas aqui que compreendem porções biohidrolizáveis como amidas biohidrolizáveis, ésteres biohidrolizáveis, carbamatos biohidrolizáveis, carbonatos biohidrolizáveis, ureídas biohidrolizáveis, e análogos de fosfato biohidrolizáveis. Outros exemplos de profármacos incluem derivados de compostos de qualquer uma das fórmulas reveladas aqui que compreendem porções -NO, -NO₂, -ONO, ou -ONO₂. Profármacos podem tipicamente ser preparadas usando métodos bem conhecidos, como aqueles descritos por Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5th ed); ver ainda Goodman e Gilman's, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

[000152] Uma forma preferencial de profármaco da invenção inclui compostos (com ou sem qualquer grupo ligante) e conjugados da invenção compreendendo um aduto formado entre uma ligação imina

dos compostos/conjugados e um reagente reativo imina.

[000153] O termo "**reagente reativo imina**" refere-se a um reagente que é capaz de reagir com um grupo imina. Exemplos de reagente reativo imina incluem, entre outros, sulfitos (H_2SO_3 , H_2SO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono, di, tri, e tetra- tiofosfatos (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), ésteres de tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), várias aminas (hidroxil amina (por exemplo, NH_2OH), hidrazina (por exemplo, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^{ii}\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$, tiosulfato ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ ou um sal formado com um cátion), hidrazida ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), nucleotídeo glicado (como GDP-mannose), fludarabina ou uma mistura dos mesmos, em que R^i and R^{ii} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e são substituídos por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i and R^{ii} pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterocíclica ou heteroaril (preferencialmente, R^k é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; mais preferencialmente, R^k é metila, etila ou propila). Preferencialmente, o cátion é um cátion monovalente, como Na^+ ou K^+ . Preferencialmente, o reagente reativo

imina é selecionado de sulfitos, hidroxil amina, ureia e hidrazina. Mais preferencialmente, o reagente reativo imina é NaHSO_3 ou KHSO_3 .

[000154] Como usado aqui salvo se indicado de outra forma, os termos "**amida biohidrolizável**," "**éster biohidrolizável**," "**carbamato biohidrolizável**," "**carbonato biohidrolizável**," "**ureída biohidrolizável**" e "**análogo de fosfato biohidrolizável**" significa uma amida, éster, carbamato, carbonato, ureida, ou análogo fosfato, respectivamente, que: 1) não destrói a atividade biológica do composto e confere àquele composto propriedades vantajosas *in vivo*, como absorção, duração da ação, ou início da ação; ou 2) é por si só biologicamente inativo mas é convertido *in vivo* a um composto biologicamente ativo. Exemplos de amidas biohidrolizáveis incluem, entre outros, alquil amidas inferiores, α -aminoácido amidas, alcoxiacil amidas, e alquilaminoalquilcarbonil amidas. Exemplos de ésteres biohidrolizáveis incluem, entre outros, ésteres de alquil inferiores, ésteres alcoxiacilóxi, ésteres alquil acilamina alquila, e ésteres de colina. Exemplos de carbamatos biohidrolizáveis incluem, entre outros, alquilaminas inferiores, etilenodiaminas substituídas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas e heteroaromáticas, e aminas poliéter. Profármacos e sais de profármaco particularmente favorecidos são aqueles que aumentam a biodisponibilidade dos compostos desta invenção quando ditos compostos são administrados a um mamífero.

[000155] A frase "**sal farmaceuticamente aceitável**" como usado aqui, refere-se sais orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis de um composto da invenção. Sais exemplares incluem, entre outros, sais de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato,

glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato," etanosulfonato, benzenosulfonato, p-toluenossulfonato, pamoato (ou seja, sais de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sais de metal alcalino (por exemplo, sódio e potássio), sais de metal alcalinoterroso (por exemplo, magnésio), e sais de amônio. Um sal farmaceuticamente aceitável pode envolver a inclusão de outra molécula como um íon acetato, um íon succinato ou outro contraíon. O contraíon pode ser uma porção orgânica ou inorgânica que estabiliza a carga no composto parente. Além disso, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter mais do que um átomo carregado em sua estrutura. Casos onde vários átomos carregados são parte do sal farmaceuticamente aceitável podem ter vários contraíons. Assim, um sal farmaceuticamente aceitável pode ter um ou mais átomos carregados e/ou um ou mais contraíon.

[000156] Se o composto da invenção é uma base, o sal farmaceuticamente aceitável desejado pode ser preparado por qualquer método disponível na técnica, por exemplo, tratamento da base livre com um ácido inorgânico, como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfônico, ácido fosfórico e semelhantes, ou com um ácido orgânico, como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malônico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, um ácido piranosidila, como ácido glicurônico ou ácido galacturônico, um ácido alfa-hidróxi, como ácido cítrico ou ácido tartárico, um aminoácido, como ácido aspártico ou ácido glutâmico, um ácido aromático, como ácido benzoico ou ácido cinâmico, um ácido sulfônico, como ácido p-toluenosulfônico ou etanosulfônico, ou semelhantes.

[000157] Se o composto da invenção é um ácido, o sal farmaceuticamente aceitável desejado pode ser preparado por qualquer método apropriado, por exemplo, tratamento do ácido livre com uma

base inorgânica ou orgânica, como uma amina (primária, secundária ou terciária), um hidróxido de metal alcalino ou um hidróxido de metal alcalinoterroso, ou semelhantes. Exemplos ilustrativos de sais apropriados incluem, entre outros, sais orgânicos derivados de aminoácidos, como glicina e arginina, amônia, aminas primária, secundária, e terciária, e aminas cíclicas, como piperidina, morfolina e piperazina, e sais inorgânicos derivados de sódio, cálcio, potássio, magnésio, manganês, ferro, cobre, zinco, alumínio e lítio.

[000158] Como usado aqui, o termo "**solvato**" significa um composto que ainda inclui uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de solvente como água, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etila, ácido acético, e etanolamina diclorometano, 2-propanol, ou semelhantes, ligado por forças intermoleculares não covalentes. Solvatos ou hidratos dos compostos são prontamente preparados por adição de pelo menos um equivalente molar de um solvente hidroxílico como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol ou água ao composto que resulta em solvatação ou hidratação da porção imina.

[000159] Um "**metabólito**" é um produto produzido pelo metabolismo no corpo de um composto específico, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, ou sal do mesmo. Metabólitos de um composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, podem ser identificados usando técnicas de rotina conhecidas na técnica e suas atividades determinadas usando testes como aqueles descritos aqui. Ditos produtos podem resultar, por exemplo, da oxidação, hidroxilação, redução, hidrólise, amidação, deamidação, esterificação, deesterificação, clivagem enzimática, e semelhantes, do composto administrado. Assim, a invenção inclui metabólitos de compostos, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, da invenção, incluindo compostos, um derivado do mesmo, ou um conjugado do

mesmo, produzido por um processo compreendendo contatar um composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo, desta invenção com um mamífero por um período de tempo suficiente para gerar um produto metabólico do mesmo.

[000160] A frase "**farmaceuticamente aceitável**" indica que a substância ou composição devem ser compatíveis quimicamente e/ou toxicologicamente, com os outros ingredientes compreendendo uma formulação, e/ou o mamífero sendo tratado com este.

[000161] O termo "**grupo protetor**" ou "**porção protetora**" refere-se a um substituinte que é comumente empregado para bloquear ou proteger uma funcionalidade particular enquanto reagindo com outros grupos funcionais no composto, um derivado do mesmo, ou um conjugado do mesmo. Por exemplo, um "**grupo protetor de amina**" ou uma "**porção protetora de amino**" é um substituinte ligado a um grupo amino que bloqueia ou protege a funcionalidade amino no composto. Ditos grupos são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, P. Wuts and T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ) e exemplificado por carbamatos como metila e etil carbamato, Fmoc, carbamatos etil substituído, carbamatos clivados por 1,6- β -eliminação (também chamado de "**auto imolativo**"), ureias, amidas, peptídeos, alquila e arila derivadas. Grupos protetores amino apropriados incluem acetila, trifluoracetila, t-butoxicarbonila (BOC), benziloxicarbonila (CBZ) e 9-fluorenilmetilenoxicarbonila (Fmoc). Para uma descrição geral de grupos protetores e seus usos, ver P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2007.

[000162] O termo "**grupo de saída**" refere-se a um grupo de porção carregada ou não carregada que se afastar durante uma substituição ou deslocamento. Ditos grupos de saída são bem conhecidos na técnica e incluem, entre outros, halogênios, ésteres, alcóxi, hidroxila, tosilatos,

triflatos, mesilatos, nitrilas, azida, carbamato, dissulfetos, tioésteres, tioéteres e compostos diazônio.

[000163] O termo "**agente de reticulação bifuncional**," "**ligante bifuncional**" ou "**agentes de reticulação**" refere-se a agentes de modificação que possuem dois grupos reativos conectados a um "grupo ligante"; um dos quais é capaz de reagir com um agente de ligação à célula enquanto o outro reage com o composto citotóxico para ligar as duas porções juntas. Ditos reticulantes bifuncionais são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Isalm and Dent em *Bioconjugation* capítulo 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Por exemplo, agentes de reticulação bifuncionais que permitem a ligação através de uma ligação tioéter incluem *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para introduzir grupos maleimido, ou com *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introduzir grupos iodoacetila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que introduzem grupos maleimido ou grupos haloacetila em um agente de ligação à célula são bem conhecidos na técnica (ver pedido de patente US 2008/0050310, 20050169933, disponível de Pierce Biotechnology Inc., P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) e incluem, entre outros, bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, éster *N*-(β-maleimidopropilóxi)succinimida (BMPS), éster *N*-succinimidila de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster *N*-hidroxisuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), ácido 4-(4-*N*-maleimidofenil)-butírico hidrazida ou sal HCl (MPBH), *N*-succinimidil-3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), iodoacetato de *N*-succinimidila (SIA), éster *N*-succinimidila de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-

butirato (SMPB), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-iodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), m-maleimidobenzoil-N-hidroxi-sulfosuccinimida éster (sulfo-MBS), N-(γ -maleimidobutirilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-GMBS), N-(ϵ -maleimidocaproilóxi)sulfosuccinimido éster (sulfo-EMCS), N-(κ -maleimidoundecanoilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-KMUS), e sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB).

[000164] Agentes de reticulação heterobifuncionais são agentes de reticulação bifuncionais contendo dois grupos reativos diferentes. Agentes de reticulação heterobifuncionais contendo ambos um grupo amina-reativa *N*-hidroxisuccinimida (grupo NHS) e um grupo carbonil-reativo hidrazina pode ainda ser usado para ligar os compostos citotóxicos descritos aqui com um agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo). Exemplos de ditos agentes de reticulação heterobifuncionais comercialmente disponíveis incluem succinimidil 6-hidrazinonicotinamida acetona hidrazona (SANH), succinimidil-4-hidrazidotereftalato cloridrato (SHTH) e succinimidil hidrazinio nicotinato cloridrato (SHNH). Conjugados contendo uma ligação lábil a ácido podem ainda ser preparados usando um derivado de benzodiazepina contendo hidrazina da presente invenção. Exemplos de agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados incluem benzoato de succinimidil-p-formila (SFB) e succinimidil-p-formilfenoxiacetato (SFPA).

[000165] Agentes de reticulação bifuncionais que permitem a ligação de agente de ligação à célula com compostos citotóxicos através de

ligações dissulfeto incluem *N*-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, e outros agentes conhecidos na técnica que incluem *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio) 2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introduzir grupos ditiopiridila. Outros agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados para introduzir grupos dissulfeto são conhecidos na técnica e são revelados nas patentes U.S. 6.913.748, 6.716.821 e publicações de patente US 20090274713 e 20100129314, todos os quais são incorporados aqui por referência. Alternativamente, agentes de reticulação como 2-iminotiolane, homocisteína tiolactona ou S-acetilsuccínico anidreto que introduz grupos tiol podem ainda ser usados.

[000166] Um "**ligante**," "**porção ligante**," ou "**grupo ligante**" como definido aqui refere-se a uma porção que conecta duas porções, como agente de ligação à célula e um composto citotóxico, juntos. Um agente de ligação cruzada bifuncional pode compreender dois grupos reativos, um em cada uma das extremidades de uma porção ligante, de modo que um grupo reativo pode ser primeiro reagido com o composto citotóxico para fornecer um composto contendo a porção ligante e um segundo grupo reativo, que pode então reagir com um agente de ligação à célula. Alternativamente, uma extremidade do agente de ligação cruzada bifuncional pode ser primeiro reagida com o agente de ligação à célula para fornecer um agente de ligação à célula contendo uma porção ligante e um segundo grupo reativo, que pode então reagir com um composto citotóxico. A porção ligante pode conter uma ligação química que permite a liberação da porção citotóxica em um local particular. Ditas ligações químicas são bem conhecidos na técnica e incluem ligações dissulfeto, ligações tioéter, ligações lábeis a ácido, ligações fotolábeis, ligações lábeis a peptidase e ligações lábeis a

esterase (ver, por exemplo, Patentes US 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073). São preferenciais as ligações dissulfeto, ligações lábeis a tioéter e peptidase. Outros ligantes que podem ser usados na presente invenção incluem ligantes não cliváveis, como aqueles descritos em detalhe na publicação US 20050169933, ou ligantes carregados ou ligantes hidrofílicos e são descritos em US 2009/0274713, US 2010/01293140 e WO 2009/134976, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência.

[000167] Em uma modalidade, o grupo de ligação com um grupo reativo ligado em uma extremidade, como um éster reativo, é selecionado da seguinte

"Lista 1":

-O(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

O(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

O(CR₂₀R₂₁)_m(alquilil)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

O(CR₂₀R₂₁)_m(piperazino)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

O(CR₂₀R₂₁)_m(pirrolo)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

O(CR₂₀R₂₁)_mA"_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"

,

-S(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

S(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

S(CR₂₀R₂₁)_m(alquinil)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

S(CR₂₀R₂₁)_m(piperazino)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

S(CR₂₀R₂₁)_m(pirrolo)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

S(CR₂₀R₂₁)_mA"_m"(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX"

,

-

NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_m(CR₂₆=CR₂₇)_{m'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_m(alquinil)_{n'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

NR₃₃(C=O)_p"(CR₂₀R₂₁)_m(piperazino)_{t'}(CR₂₂R₂₃)_n(OCH₂CH₂)_p(CR₄₀R₄₁)_p"Y"(CR₂₄R₂₅)_q(CO)_tX",

-

$$\text{NR}_{33}(\text{C}=\text{O})_p(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{pirrolo})_t(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$\text{NR}_{33}(\text{C}=\text{O})_p(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m\text{A}''_m(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

$$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{26}=\text{CR}_{27})_{m'}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{alquinil})_{n'}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{piperazino})_t(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

$$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m\text{A}''_m(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

$$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-$$

$$\text{NR}_{30})_n(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

$$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-$$

$$\text{NR}_{30})_n(\text{CR}_{26}=\text{CR}_{27})_{m'}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''$$

$$(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-\text{NR}_{30})_n(\text{alquinil})_{n'}(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q$$

$$(\text{CO})_t\text{X}'',$$

-

$$(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-\text{NR}_{30})_n\text{A}''_m(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t$$

$$\text{X}'',$$

em que:

[000168] m, n, p, q, m', n', t' são inteiros de 1 a 10, ou são opcionalmente 0;

[000169] t, m'', n'' e p'' são 0 ou 1;

[000170] X'' é selecionado de OR₃₆, SR₃₇, NR₃₈R₃₉, em que R₃₆, R₃₇, R₃₈, R₃₉ são H, ou alquil cíclico ou, alquenila ou alquinila linear, ramificado contendo de 1 a 20 átomos de carbono e, ou, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, R₃₇, opcionalmente, é um grupo tiol protetor quando t = 1, COX'' forma um éster reativo selecionado de ésteres N-hidroxisuccinimida, ésteres N-hidroxitálida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, ésteres pentafluorfenila e seus derivados, em que ditos derivados facilitam formação de ligação amida;

[000171] Y'' é ausente ou é selecionado de O, S, S-S ou NR₃₂, em que R₃₂ tem a mesma definição conferida acima para R, ou

[000172] quando Y'' não é S-S e t = 0, X'' é selecionado de um grupo maleimido, um grupo haloacetila ou SR₃₇, em que R₃₇ tem a mesma definição como acima;

[000173] A'' é um aminoácido selecionado de glicina, alanina, leucina, valina, lisina, citrulina e glutamato ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácido;

[000174] R₂₀, R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆, e R₂₇ são os mesmos ou diferentes e são H ou uma alquila linear ou ramificada contendo de 1 a 5 átomos de carbono;

[000175] R₂₉ e R₃₀ são os mesmos ou diferentes e são H ou alquila de 1 a 5 átomos de carbono;

[000176] R₃₃ é H ou alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 12 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, ou R₃₃ é -COR₃₄, -CSR₃₄, -SOR₃₄, ou -SO₂R₃₄, em que R₃₄ é H ou alquila, alquenila ou alquinila linear,

ramificada ou cíclica contendo de 1 a 20 átomos de carbono ou, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n$; e

[000177] um de R_{40} e R_{41} é opcionalmente um grupo funcional carregado negativamente ou positivamente e o outro é H ou alquila, alquenila, alquinil contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[000178] O termo "**aminoácido**" refere-se aos aminoácidos de ocorrência natural ou aminoácido de ocorrência não natural representado por $NH_2-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)OH$, em que R^{aa} e $R^{aa'}$ são cada um independentemente H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heteroarila ou heterociclila. O termo "aminoácido" ainda refere-se ao correspondente resíduo quando um átomo de hidrogênio é removido de extremidade amina e/ou carbóxi do aminoácido, como $-NH-C(R^{aa'}R^{aa})-C(=O)O-$.

[000179] O termo "**cátion**" refere-se um íon com carga positiva. O cátion pode ser monovalente (por exemplo, Na^+ , K^+ , *etc.*), bi-valente (por exemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , *etc.*) ou multi-valente (por exemplo, Al^{3+} *etc.*). Preferencialmente, o cátion é monovalente.

[000180] O termo "**quantidade terapeuticamente eficaz**" significa a quantidade de composto ativo ou conjugado que induz a resposta biológica em um sujeito. Dita resposta alívio de sintomas da doença ou distúrbio sendo tratado, prevenção, inibição ou um atraso na recorrência do sintoma da doença ou a própria doença, um aumento na longevidade do sujeito comparado com a ausência do tratamento, ou prevenção, inibição ou atraso na progressão do sintoma da doença ou a própria doença. Determinação da quantidade efetiva está dentro da capacidade daquelas especialistas na técnica, especialmente à luz da revelação detalhada fornecida aqui. A toxicidade e eficácia terapêutica do composto I podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células e em animais experimentais A

quantidade efetiva de composto ou conjugado da presente invenção ou outro agente terapêutico a ser administrados a um sujeito irá depender do estágio, categoria e estado do mieloma múltiplo e características do sujeito, como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância ao fármaco. A quantidade efetiva de composto da presente invenção ou outro agente terapêutico a serem administrados irão ainda depender da via de administração e forma de dosagem. A quantidade de dosagem e intervalo podem ser ajustados individualmente para fornecer níveis plasmáticos do composto ativo que são suficientes para manter os efeitos terapêuticos desejados.

[000181] O termo "**grupo reativo tiol**" refere-se a um grupo funcional que irá reagir com uma porção tiol. Exemplos de grupo reativo tiol incluem, entre outros, maleimido, vinilpiridina, vinil sulfona, vinil sulfonamida, um grupo a base de haloacetila (por exemplo, haloacetamido) ou um dissulfeto (por exemplo, $-SSR^d$, em que R^d é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila, 2-nitropiridila, 4-nitropiridila, ou 3-carboxi-4-nitropiridila).

[000182] O termo "**éster reativo**" refere-se a um éster contendo um grupo de saída que é prontamente disperso por um grupo amina ou um grupo hidroxila. Exemplos de ésteres reativos incluem, entre outros, éster N-hidroxisuccinimida, éster N-hidróxi sulfosuccinimida, éster nitrofenila, éster dinitrofenila, éster tetrafluorfenila, éster sulfo-tetrafluorfenila, e éster pentafluorfenila. Preferencialmente, o éster reativo é éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

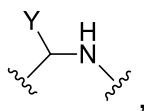
[000183] O termo "**um fármaco contendo imina**" ou "**um composto citotóxico contendo imina**" refere-se a um composto descrito aqui (sem um grupo ligante) que tem pelo menos um grupo funcional imina. Preferencialmente, o fármaco contendo imina contém um grupo funcional imina.

Métodos da presente invenção

[000184] Em um primeiro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir um composto citotóxico com um CBA modificado em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, em que:

a) o CBA modificado compreende um resíduo de um agente de ligação cruzada bifuncional ligado ao CBA, e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo tiol; e

b) o composto citotóxico compreende um grupo tiol, e um grupo representado por:



em que:

[000185] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou

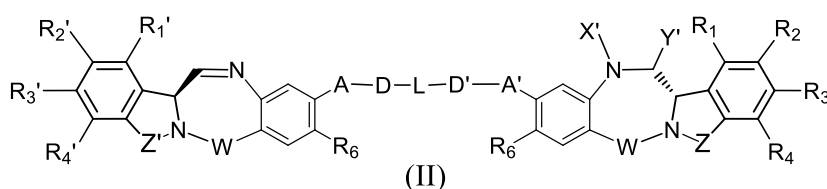
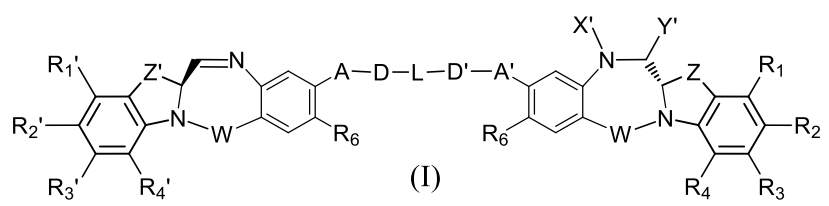
ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; R^{k'} é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila.

[000186] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico é produzido reagindo um composto citotóxico contendo imina contendo o grupo tiol com um reagente reativo imina.

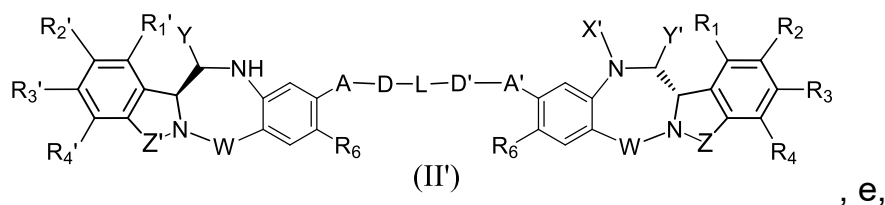
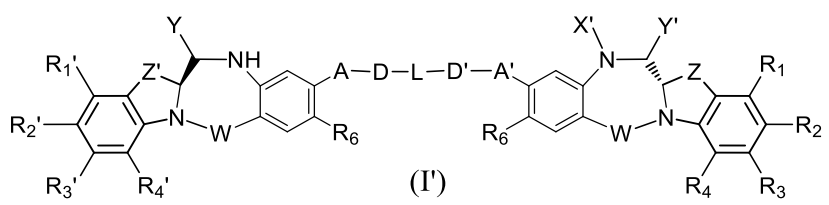
[000187] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender purificar o composto citotóxico antes de reagir o CBA modificado.

[000188] Em determinadas modalidades,

(1) o composto citotóxico contendo imina é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:

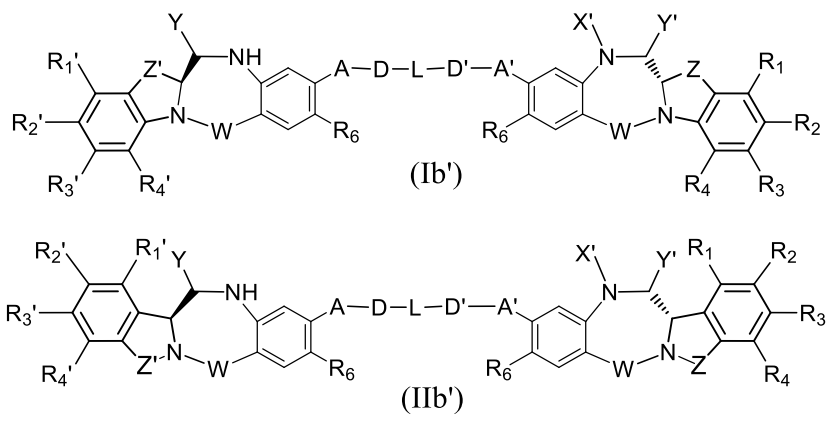


(2) o composto citotóxico é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



, e,

(3) o composto citotóxico e a porção do grupo de ligação do conjugado é representada por uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000189] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000190] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[000191] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000192] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

[000193] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000194] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000195] n é um inteiro de 1 a 24;

[000196] W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

[000197] R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, ou halogênio;

[000198] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_n$ -, -

$(\text{CH}_2)_n\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$, $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-NR}_9\text{-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$, $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-O-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$ e $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-S-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$;

[000199] n' e $n'a$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[000200] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000201] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$;

[000202] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $\text{-N(R}_5\text{)-}$ e $\text{-CRR'N(R}_5\text{)-}$,

[000203] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000204] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$;

[000205] L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, ou é uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos

independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída;

[000206] em que pelo menos um de X', Y', R₆, R^c, R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃', R₄', L (por exemplo, através de um grupo opcionalmente substituído), é ligado ao grupo de ligação in formulas (Ib') ou (IIb').

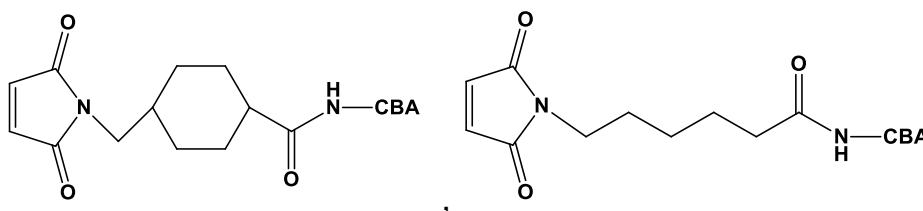
[000207] Em determinadas modalidades, o CBA modificado é preparado reagindo o CBA com o agente de ligação cruzada bifuncional, dito agente de ligação cruzada bifuncional compreendendo o grupo reativo tiol e um grupo reativo com o CBA, ambos ligados ao grupo de ligação.

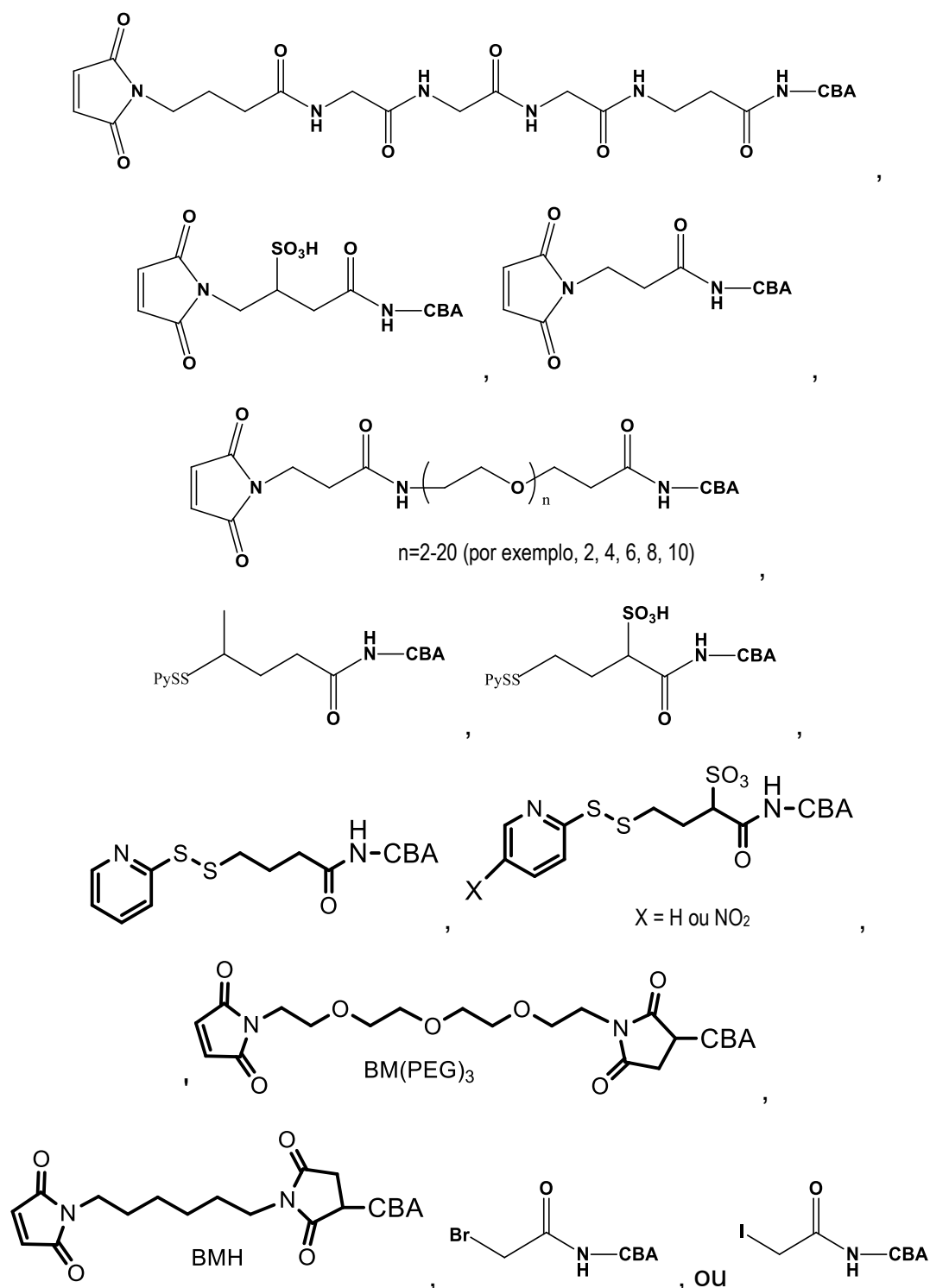
[000208] Em determinadas modalidades, o grupo reativo com o CBA reage com um grupo amino do CBA (como o grupo amino de uma cadeia lateral Lys), ou com um grupo tiol do CBA (como o grupo tiol de uma cadeia lateral Cys).

[000209] Em determinadas modalidades, o grupo reativo tiol é selecionado do grupo que consiste em maleimido, vinilpiridina, vinil sulfona, vinil sulfonamida, um grupo a base de haloacetila e um grupo dissulfeto.

[000210] Alternativamente, o grupo reativo tiol pode ser maleimido, haloacetamido ou -SSR^d, em que R^d é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila, 2-nitropiridila, 4-nitropiridila, ou 3-carboxi-4-nitropiridila.

[000211] Em determinadas modalidades, o CBA modificado é:





[000212] Um esquema de reação exemplar é mostrado na FIG. 8, em que "etapa um," um reagente reativo imina (mostrado no esquema de reação como um nucleófilo (Nuc:)) é adicionado ao fármaco contendo um tiol e deixado reagir e formar um fármaco modificado contendo o

grupo tiol. O fármaco modificado é opcionalmente purificado pra remover excesso de reagente reativo imina. Na "etapa dois," o anticorpo é modificado com um ligante contendo um grupo reativo tiol X (maleimida, SSPy, vinil sulfona, *etc*), e reagido com o fármaco modificada contendo o grupo tiol em pH 6-9 para gerar uma ligação estável dissulfeto ou tioéter entre o fármaco e o anticorpo. Na "etapa três," os produtos laterais (como excesso de reagente reativo imina, o fármaco modificado que não reage com o anticorpo, *etc.*) é removido e o conjugado são formulados. O número de moléculas do fármaco conjugado ao anticorpo é igual a n, que pode ser de, por exemplo, 1-10.

[000213] Um exemplo representativo de um método de conjugação de duas etapas é descrito em FIG. 16, em que um anticorpo é primeiro modificado com um agente de ligação cruzada bifuncional resultando em um anticorpo que possui um número desejado de ligantes apropriados para a reação com um composto dímero contendo uma porção tiol livre. Neste exemplo o anticorpo huMy9-6 foi primeiro modificado com SPDB para gerar um anticorpo com ligantes contendo a porção ditiopiridila. O anticorpo modificado foi então exposto a um tiol livre, como 2a, gerando o conjugado desejado huMy9-6-SPDB-2a. Ligantes reativos tiol apropriados adicionais que podem ser usados em reações semelhantes são incluídos na FIG. 16.

[000214] O reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco contendo um grupo tiol em solvente orgânico (por exemplo, dimetilacetamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrila, etanol, metanol, metileno cloreto, clorofórmio, dioxano, ou uma mistura dos mesmos) ou uma mistura de água (por exemplo, água deionizada) e um ou mais solventes orgânicos. Quando somente o solvente orgânico é usado, o reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco em temperatura ambiente por 30 min ou mais (por exemplo, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5

horas, cerca de 10 horas, cerca de 24 horas ou até a reação ser completa). Preferencialmente, o tempo de incubação/reação é cerca de 0-4 h, ou 1-3 h. A mistura resultante pode ser imediatamente usada para reagir com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) modificada com um grupo reativo tiol tamponado em pH cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9. Alternativamente, a mistura pode ser congelada e armazenada, por exemplo, a -20°C ou -80°C, e usada posteriormente enquanto mantendo sua reatividade com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo). Se uma mistura de água e solventes orgânicos é usada como um sistema miscível cossolvente (por exemplo, água e dimetilacetamida), a mistura de reação do fármaco e reagente reativo imina é usada imediatamente ou mantida congelada até o uso após a mistura para reagir com o agente de ligação à célula contendo um grupo reativo tiol. Se uma mistura de água e solventes orgânicos é usada como um sistema de cossolvente não miscível (por exemplo, água e cloreto de metileno), o fármaco e o reagente reativo imina são misturados por 10 min ou mais (por exemplo, cerca de 30 mins, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 5 horas, cerca de 10 horas, cerca de 24 horas ou até a reação ser completa), e a camada aquosa é coletada, quantificada por um fármaco e tioreativo (por exemplo, por espectroscopia UV e ensaio de Ellman com DTNB (reagente ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico))) e adicionado ao agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) contendo um grupo reativo tiol tamponado a pH de cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9.

[000215] Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir o CBA com um composto citotóxico contendo imina, um reagente reativo imina, e um agente de ligação

cruzada bifuncional compreendendo o grupo de ligação para formar o conjugado.

[000216] Em determinadas modalidades, o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) é contatado com um fármaco (por exemplo, o composto citotóxico contendo imina) e um reagente reativo imina para formar uma primeira mistura; e a primeira mistura é então contatada com um agente de ligação cruzada bifuncional para formar o conjugado de agente de ligação à célula-fármaco. Preferencialmente, o agente de ligação cruzada bifuncional é contatado com a primeira mistura imediatamente após a formação da primeira mistura. Alternativamente, a primeira mistura foi mantida por um intervalo de tempo (por exemplo, cerca de 1-10 min, cerca de 10-30 min, cerca de 30 min a 1 h, cerca de 1 a 5 h, cerca de 5 a 24 h, ou cerca de 1 a 2 dias) antes de ser contatado com um agente de reticulação bifuncional.

[000217] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender purificar o conjugado.

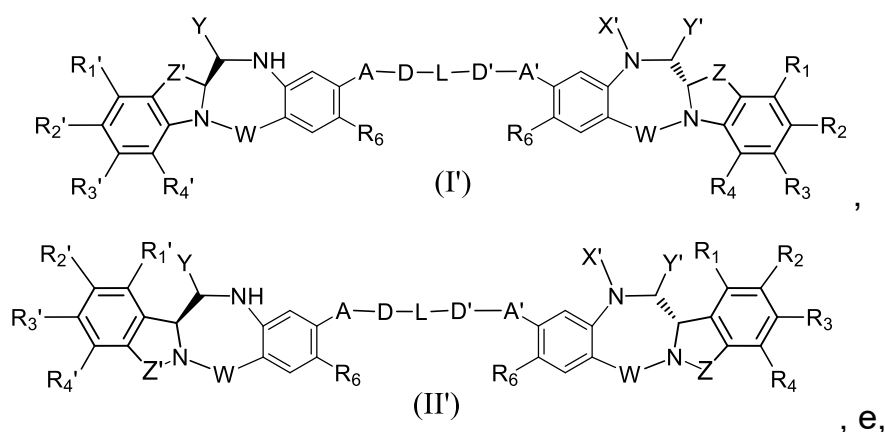
[000218] Um esquema de reação exemplar é mostrado na FIG. 10, em que na "etapa 1," um reagente reativo imina (mostrado no esquema de reação como um nucleófilo (Nuc:)) é adicionado ao CBA (por exemplo, um anticorpo), um fármaco contendo um tiol, um agente de ligação cruzada bifuncional contendo ambos um grupo reativo tiol X (maleimida, SSPy, vinil sulfona, *etc*) e um grupo éster reativo, e deixada a reação proceder a pH 6-9 para gerar um conjugado de fármaco-anticorpo estável. Na "etapa dois," os produtos laterais (como excesso de reagente reativo imina, o fármaco modificada que não reage com o anticorpo, *etc.*) são removidos e o conjugado é formulado. O número de moléculas de um fármaco conjugadas ao anticorpo é igual a n, que pode ser de, por exemplo, 1-10.

[000219] Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de

ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo:

a) reagir um composto citotóxico com um agente de ligação cruzada bifuncional compreendendo o grupo de ligação, um grupo reativo com o CBA (como um grupo tiol, um grupo maleimido, um grupo haloacetamida, ou um grupo amina), e um grupo reativo com o composto citotóxico, para formar um composto citotóxico modificado covalentemente ligado a um resíduo do agente de ligação cruzada bifuncional, em que o resíduo compreende o grupo de ligação e o grupo reativo com o CBA;

[000220] em que o composto citotóxico é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



em que:

[000221] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiosulfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiosulfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$

ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila;

[000222] X' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000223] Y' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[000224] R^c é $-\text{H}$ ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000225] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃M⁺, um sulfato -OSO₃M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

[000226] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionado do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000227] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000228] n é um inteiro de 1 a 24;

[000229] W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

[000230] R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, ou, halogênio;

[000231] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_n-$, -

$(\text{CH}_2)_n\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$, $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-NR}_9\text{-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$, $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-O-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$ e $\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-S-(CH}_2\text{)}_{n'a}\text{-}$;

[000232] n' e $n'a$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[000233] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000234] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$;

[000235] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, $\text{-N(R}_5\text{)-}$ e $\text{-CRR'N(R}_5\text{)-}$,

[000236] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

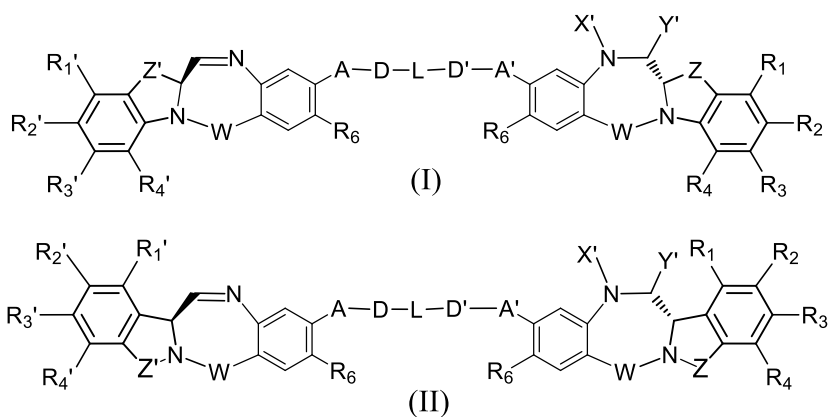
[000237] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$;

[000238] L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, ou é uma unidade de polietilenoglicol $\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_n\text{-}$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos

independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída; e,

b) reagir o composto citotóxico modificado com o CBA através do grupo reativo com o CBA, em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, para formar o conjugado.

[000239] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico é produzido reagindo um composto citotóxico contendo imina contendo o grupo tiol da seguinte fórmulas com um reagente reativo imina em uma mistura de reação



[000240] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender purificar o composto citotóxico antes da etapa a).

[000241] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender purificar o composto citotóxico modificado antes da etapa b).

[000242] Em determinadas modalidades, a mistura de reação é armazenada congelada antes de a mistura congelada ser descongelada e etapa a) ser realizada.

[000243] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender armazenar a mistura de reação da etapa a) congelada antes de descongelar e antes da etapa b) ser realizada.

[000244] Em determinadas modalidades, o agente de ligação cruzada bifuncional é bis-maleimido-hexano ou BMPEO.

[000245] Um esquema de reação exemplar é mostrado na FIG. 11, em que na "etapa 1," um reagente reativo imina (mostrado no esquema de reação como um nucleófilo (Nuc:)) é adicionado a um composto citotóxico contendo um tiol. O composto citotóxico resultante é opcionalmente purificado, antes de o composto citotóxico é reagido em "etapa dois" com um agente de ligação cruzada bifuncional (como um bismaleimido-hexano ou BMPEO) para produzir uma segunda fármaco modificada contendo um grupo de reação tiol. Então na "etapa três," um CBA contendo tiol (como anticorpo) é adicionado, e a reação é deixada proceder (em pH 6-9) para gerar um conjugado de fármaco-anticorpo estável. Na "etapa quatro," os produtos laterais (como excesso de reagente reativo imina, o fármaco modificada que não reage com o anticorpo, *etc.*) são removidos e o conjugado é formulado. O número de moléculas de um fármaco conjugada ao anticorpo é igual a n , que pode ser de, por exemplo, 1-10.

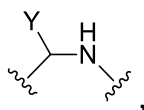
[000246] O reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco contendo um grupo reativo tiol em solvente orgânico (por exemplo, dimetilacetamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrila, etanol, metanol, metileno cloreto, clorofórmio, dioxano, ou uma mistura dos mesmos) ou uma mistura de água (por exemplo, água deionizada) e uma ou mais solventes orgânicos. Quando somente o solvente orgânico é usado, o reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco em temperatura ambiente por 30 min ou mais (por exemplo, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 10 horas, cerca de 24 horas ou até a reação ser completa). Preferencialmente, o tempo de incubação/reação é cerca de 0-4 h, ou 1-3 h. A mistura resultante pode ser usada imediatamente para reagir com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) modificado com um grupo reativo tiol tamponado a pH cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9. Alternativamente, a

mistura pode ser congelada e armazenada, por exemplo, a -20°C ou -80°C, e usada posteriormente enquanto mantendo sua reatividade com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo). Se uma mistura de água e solventes orgânicos é usada como um sistema cossolvente miscível (por exemplo, água e dimetilacetamida), a mistura de reação do fármaco e o reagente reativo imina é usado imediatamente após misturar ou mantida congelada até o uso para reagir com o agente de ligação à célula contendo um grupo reativo tiol. Se uma mistura de água e solventes orgânicos é usado como um sistema de cossolvente não miscível (por exemplo, água e cloreto de metileno), o fármaco e o reagente reativo imina são misturados por 10 min ou mais (por exemplo, cerca de 30 min, cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 5 horas, cerca de 10 horas, cerca de 24 horas ou até a reação ser completa), e a camada aquosa é coletada, quantificada por um fármaco (por exemplo, por espectroscopia UV) e adicionada ao agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) contendo um grupo tiol tamponado um pH de cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9.

[000247] Em um quarto aspecto, a presente invenção é direcionada a um método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação à célula (CBA) a um composto citotóxico com um grupo ligante, o método compreendendo reagir um composto citotóxico modificado com o CBA em um pH de cerca de 4 a cerca de 9, em que o composto citotóxico modificado compreende:

a) um resíduo de um agente de ligação cruzada bifuncional ligado ao segundo composto citotóxico, e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo selecionado de um éster reativo e um grupo reativo tiol, e,

b) um grupo representado por:



em que:

[000248] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^- \text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila.

[000249] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico modificado é produzido reagindo um reagente reativo imina com um composto citotóxico contendo imina contendo o grupo de ligação e o grupo reativo.

[000250] Em determinadas modalidades, o método pode ainda compreender purificar o composto citotóxico modificado antes de reagir com o CBA.

[000251] Em determinadas modalidades, o éster reativo pode ser

selecionados do grupo que consiste em éster N-hidroxisuccinimida, éster N-hidróxi sulfosuccinimida, éster nitrofenila, éster dinitrofenila, éster tetrafluorfenila, éster sulfo-tetrafluorfenila, e éster pentafluorfenila. Preferencialmente, o éster reativo é éster N-hidroxisuccinimida.

[000252] Em determinadas modalidades, o grupo reativo tiol pode ser selecionado do grupo que consiste em maleimido, vinilpiridina, vinil sulfona, vinil sulfonamida, um grupo a base de haloacetila e um grupo dissulfeto.

[000253] Em determinadas modalidades, o grupo reativo tiol pode ser maleimido, haloacetamido ou -SSR^d, em que R^d é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila, 2-nitropiridila, 4-nitropiridila, ou 3-carboxi-4-nitropiridila.

[000254] Um esquema de reação exemplar é mostrado na FIG. 7, em que na "etapa um," um reagente reativo imina (mostrado no esquema de reação as a nucleófilo (Nuc:)) é adicionado ao fármaco contendo um éster reativo (**1c**) e deixado reagir para formar um fármaco modificada. o fármaco modificado pode ser opcionalmente purificado para remover o excesso de reagente reativo imina. Na "etapa dois," o fármaco modificado com um éster reativo é reagido com um anticorpo tamponado a pH 6-9. Na "etapa três," os produtos laterais (como excesso reagente reativo imina, fármaco modificada que não reage com o anticorpo, *etc.*) são removidos, e o conjugado é formulado. O número de moléculas de um fármaco conjugado ao anticorpo é igual a n, que pode ser de, por exemplo, 1 a 10.

[000255] Outro esquema de reação que descreve um método exemplar da presente invenção é mostrado na FIG. 9. Na "etapa um," um reagente reativo imina é adicionado ao fármaco contendo um grupo reativo tiol (onde R é grupo maleimida, SSPy, *etc.*) e deixado reagir e forma um fármaco modificada. o fármaco modificado é opcionalmente

purificado para remover excesso reagente reativo imina. Na "etapa dois," o fármaco modificado é reagido com um anticorpo contendo um tiol reativo para formar um conjugado anticorpo-fármaco contendo anticorpo covalentemente ligado ao fármaco através de uma ligação dissulfeto ou tioéter estável. Anticorpos com grupo tiol reativo podem ser gerados por métodos descritos aqui, por exemplo, reduzindo dissulfetos intercadeia, geneticamente codificando cisteína, ou modificando anticorpo com ligantes contendo tiois ou tiois quimicamente mascarados. Na "etapa três," o fármaco que não reage com o anticorpo é removida e o conjugado é formulado. O número de moléculas de um fármaco conjugado ao anticorpo é igual a n , que pode ser de, por exemplo, 1-10.

[000256] O reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco contendo um éster ativado (por exemplo, éster N-hidroxisuccinimidila, éster pentafluorfenol, éster sulfo N-hidroxisuccinimidil) em um solvente orgânico (por exemplo, dimetil acetamida, etanol, cloreto de metileno, clorofórmio, dioxano, ou uma mistura dos mesmos) ou uma mistura de água (por exemplo, água deionizada) e uma ou mais solventes orgânicos. Quando somente o solvente orgânico é usado, o reagente reativo imina pode ser misturado com o fármaco em uma temperatura de 0 a 100°C, preferencialmente em uma temperatura de 0 a 30°C, mais preferencialmente em temperatura ambiente por 5 min ou mais (por exemplo, cerca de 30 min, 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 10 horas, cerca de 24 horas ou até a reação ser completa). Preferencialmente, o tempo de incubação/reação é cerca de 0-4 h, ou 1-3 h. A mistura de reação resultante pode ser usada imediatamente para reagir com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) tamponada em pH de cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9. Alternativamente, a mistura de reação pode ser congelada e

armazenada, por exemplo, em cerca de -20°C ou -80°C e usada posteriormente enquanto mantendo sua reatividade com o anticorpo. Preferencialmente, nenhuma purificação de produtos intermediários é requerida. Quando uma mistura de água e solvente orgânico é usada como um sistema de cossolvente miscível (por exemplo, água e dimetilacetamida), o fármaco e mistura de reação imina é usada imediatamente após misturar, ou mantida congelada até o uso, para reagir com o agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo). Quando uma mistura de água e solvente orgânico é usada como um sistema de cossolvente não miscível (por exemplo, água e cloreto de metileno), o fármaco e o reagente reativo imina são misturados por 10 min ou mais, e a camada aquosa é coletada, quantificada por um fármaco e adicionada ao agente de ligação à célula (por exemplo, anticorpo) tamponado a pH cerca de 4 a cerca de 9, preferencialmente cerca de 6 a cerca de 9.

[000257] Em qualquer um dos aspectos acima, uma quantidade apropriada do reagente reativo imina pode ser usada. Por exemplo, cerca de 0,1 a cerca de 30 equivalentes molares do reagente reativo imina ao fármaco pode ser usada. Preferencialmente, cerca de 1 a cerca de 10 equivalentes molares, mais preferencialmente, cerca de 1 a cerca de 5 equivalentes molares, e ainda mais preferencialmente cerca de 3 a cerca de 5 equivalentes molares do reagente reativo imina podem ser usados.

[000258] Usando este procedimento geral, em qualquer um dos aspectos acima, qualquer um dos seguintes reagentes reativos imina pode ser usados: sulfitos (H_2SO_3 , H_2SO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono, di, tri, e tetra- tiofosfatos (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), ésteres de tiofosfato

$((R^iO)_2PS(OR^i)$, R^iSH , R^iSOH , R^iSO_2H , R^iSO_3H), várias aminas (hidroxilamina (por exemplo, NH_2OH), hidrazina (por exemplo, NH_2NH_2), NH_2O-R^i , R^iNH-R^i , NH_2-R^i), $NH_2-CO-NH_2$, $NH_2-C(=S)-NH_2$, tiosulfato ($H_2S_2O_3$ ou um sal de $S_2O_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito ($H_2S_2O_4$ ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^kC(=O)NHOH$ ou um sal formado com um cátion), hidrazida ($R^kCONHNH_2$), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2H$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^-Na^+$), nucleotídeo glicado (como GDP-mannose), fludarabina ou uma mistura dos mesmos, em que R^i and R^i são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e são substituídos por pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, and $-PO_3H$; R^i and R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila (preferencialmente, R^k é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; mais preferencialmente, R^k é metila, etila ou propila). Preferencialmente, o cátion é um cátion monovalente, como Na^+ ou K^+ .

[000259] Preferencialmente, o reagente reativo imina é selecionado de sulfitos (por exemplo, $NaHSO_3$ ou $KHSO_3$), hidroxilamina, hidrazina e ureia. Mais preferencialmente, o reagente reativo imina é $NaHSO_3$ ou $KHSO_3$.

[000260] Em uma modalidade, os fármacos modificados descritos em qualquer um dos aspectos acima são purificados antes de reagir com um agente de ligação à célula. Qualquer método apropriado conhecido na técnica pode ser usado para purificar o fármaco modificado. Por

exemplo, o fármaco modificado pode ser purificado por cromatografia de coluna (por exemplo, cromatografia em sílica gel) ou HPLC.

[000261] Em outra modalidade, o conjugado agente de ligação à célula-fármaco preparado de acordo com qualquer um dos aspectos acima é purificado por filtração em fluxo tangencial, cromatografia adsortiva, filtração adsortiva, precipitação seletiva, filtração não adsortiva ou combinação dos mesmos. Preferencialmente, filtração de fluxo tangencial (TFF, ainda conhecido como filtração de fluxo cruzado, ultrafiltração e diafiltração) e/ou resinas de cromatografia adsortiva são usadas para a purificação dos conjugados.

[000262] Qualquer sistema TFF apropriado pode ser utilizado, incluindo um sistema tipo Pellicon (Millipore, Billerica, Mass.), um sistema Sartocan Cassette (Sartorius AG, Edgewood, N.Y.), e um sistema tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, N.Y.).

[000263] Qualquer resina de cromatografia adsortiva apropriada pode ser utilizada. Resinas de cromatografia adsortiva preferenciais incluem resinas para cromatografia hidroxiapatita, cromatografia de indução de carga hidrofóbica (HCIC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de troca iônica, cromatografia de troca iônica de modo misto, cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC), cromatografia de ligante a corante, cromatografia de afinidade, cromatografia de fase reversa, e combinações dos mesmos. Exemplos de resinas hidroxiapatita apropriadas incluem hidroxiapatita cerâmica (CHT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), HA Ultrogel hidroxiapatita (Pall Corp., East Hills, N.Y.), e fluorapatita de cerâmica (CFT Tipo I e Tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Um exemplo de uma resina HCIC apropriada é resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, N.Y.). Exemplos de resinas HIC apropriadas incluem resinas Butil-Sefarose, Hexil-Sepaharose, Fenil-Sefarose, e Octil Sefarose (todos de GE Healthcare, Piscataway, N.J.), bem como

resinas Macro-prep Metila e Macro-Prep t-Butil (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de resinas de troca iônica apropriadas incluem resinas SP-Sefarose, CM-Sefarose, e Q-Sefarose (todos de GE Healthcare, Piscataway, N.J.), e resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de trocadores de íon em modo misto incluem resina Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg N.J.). Exemplos de resinas IMAC apropriadas incluem resina Chelating Sefarose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) e resina Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de resinas de ligante de corante apropriado incluem resina Blue Sefarose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) e resina Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). Exemplos de resinas de afinidade apropriada incluem resina de proteína A Sefarose (por exemplo, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), onde o agente de ligação à célula é um anticorpo, e resinas de afinidade de lectina, por exemplo, resina Lentil Lectin Sefarose (GE Healthcare, Piscataway, N.J.), onde o agente de ligação à célula contém sítios de ligação de lectina apropriados. Alternativamente um anticorpo específico ao agente de ligação à célula pode ser usado. Dito um anticorpo pode ser imobilizado a, por exemplo, resina Sefarose 4 Fluxo rápido (GE Healthcare, Piscataway, N.J.). Exemplos de resinas de fase reversa apropriadas incluem resinas C4, C8, e C18 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.).

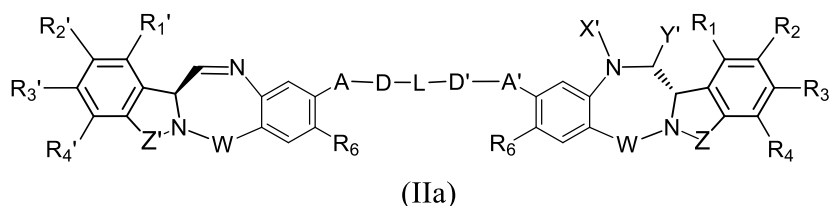
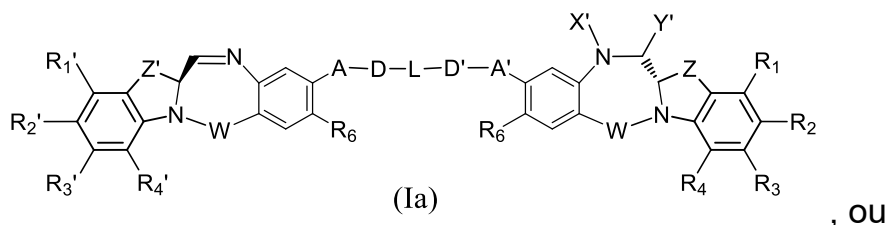
[000264] Qualquer resina de cromatografia não absorviva pode ser usada nos métodos da presente invenção. Exemplos de resinas de cromatografia apropriada incluem, entre outros, resinas SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (por exemplo, S-200 e S-300), resinas SUPERDEX™ (por exemplo, SUPERDEX™ 75 e SUPERDEX™ 200), resinas BIO-GEL® (por exemplo, P-6, P-10, P-30, P-60, e P-100), e outros conhecidos aos especialistas na técnica.

Fármacos Contendo uma Porção de Ligação

[000265] Fármacos que podem ser usados nos presente métodos incluem compostos descritos em US2010/0316656, US 2010/003641, US2010/0203007, todos os quais são incorporados aqui por referência.

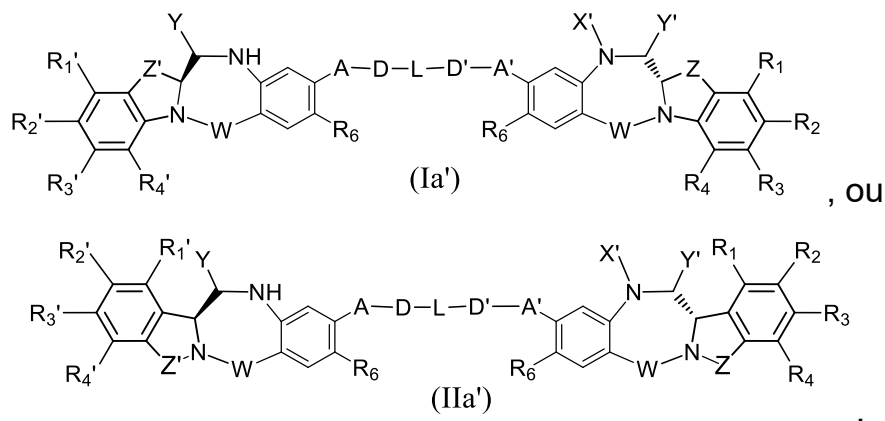
[000266] Em certas outras modalidades, compostos citotóxicos que podem ser conjugados com agentes de ligação à célula via um grupo ligante não compreendem o grupo de ligação. De fato, um reagente de reticulação bifuncional (compreendendo o grupo de ligação) pode ser requerido para conjugar o composto sem ligante com o CBA através do grupo ligante.

[000267] Assim na primeira modalidade específica, um fármaco covalentemente conectada a um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este, que pode ser usada nos métodos da presente invenção (como no método de reagente de 1-etapa como descrito no quarto aspecto da invenção acima), ou que pode ser um produto intermediário dos métodos da invenção (como o método descrito no terceiro aspecto da invenção), é um composto citotóxico contendo um grupo reativo, como um éster reativo ou um grupo reativo tiol (coletivamente "o grupo reativo"), compreendendo um grupo ligante com o grupo reativo ligado a este, capaz de covalentemente ligar o composto citotóxico ao CBA, em que o composto citotóxico é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas. Na reação com o

reagente reativo imina, os compostos citotóxicos podem ser representados por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000268] Y é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, and $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila;

[000269] X' é selecionado de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, um grupo de proteção amina, o

grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000270] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[000271] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[000272] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida

representada por $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, ciano, um azido, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$, $-\text{OCONR}'\text{R}''$, e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[000273] R , para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em $-\text{H}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000274] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{COR}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000275] n é um inteiro de 1 a 24;

[000276] W é selecionado de $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, CH_2 , BH , SO e SO_2 ;

[000277] R_6 é $-\text{H}$, $-\text{R}$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, halogênio ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[000278] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(\text{CH}_2)_{n'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{na'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{na'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{na'}$ e $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{na'}$;

[000279] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[000280] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NHR}'$, uma

unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000281] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$;

[000282] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo $(-\text{C}(=\text{O})-)$, $-\text{CRR}'\text{O}-$, $-\text{CRR}'-$, $-\text{S}-$, $-\text{CRR}'\text{S}-$, $-\text{NR}_5$ and $-\text{CRR}'\text{N}(\text{R}_5)-$;

[000283] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

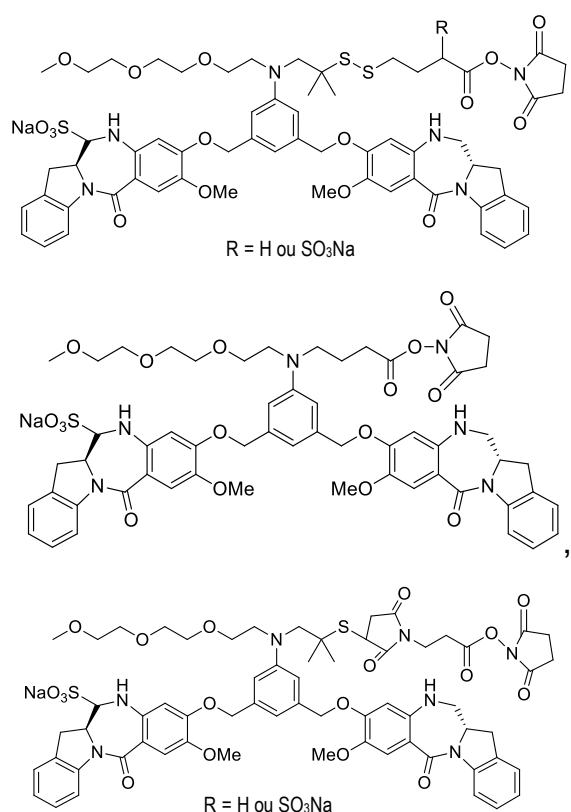
[000284] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$;

[000285] L é ausente, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que o alquila ou alquenila é opcionalmente substituída por o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; fenila ou anel heterocíclico ou heteroarila pode ser opcionalmente substituído, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[000286] Preferencialmente, L é ausente, ou é selecionado de um

grupo fenila opcionalmente substituída e um grupo piridila opcionalmente substituída, em que o grupo fenila e a piridila contêm o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou L é um grupo amina contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (ou seja, -N(grupo ligante)-), ou L é uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 6 átomos de carbono e contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[000287] Vários compostos representativos de fórmulas (Ia') e (IIa') são listados abaixo:



Em determinadas modalidades,

[000288] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, e um grupo de proteção amina. Preferencialmente, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Mais preferencialmente, X' é -H;

[000289] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou oxo. Mais preferencialmente, Y' é -H;

[000290] W é C=O;

[000291] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃', e R₄' são cada um independentemente selecionados de -H, -NR'R'', -NR'(C=O)R, -OR, -SR, -NO₂ e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Preferencialmente, um de R₂, R₃, R₂', e R₃' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este e os demais são -H;

[000292] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou fenila;

[000293] R' e R'' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou fenila;

[000294] R₆ é -OR^c ou -SR^c, em que R^c é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, R₆ é -OMe ou -SMe. Ainda mais preferencialmente, R₆ é -OMe;

[000295] Z e Z' são -CH₂-;

[000296] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O-, -S-, -NR₅ e oxo (C=O). Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-;

[000297] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol (-OCH₂CH₂)_n, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um

peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que a alquila, alquenila e alquinila são opcionalmente substituídas por uma ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais) substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR", -SR, e -COR';

[000298] Preferencialmente, D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Mais preferencialmente, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Ainda mais preferencialmente, D e D' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de uma alquila linear contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000299] L é ausente, ou é selecionado de um grupo fenila opcionalmente substituída e um grupo piridila opcionalmente substituída, em que o grupo fenila e o piridil contêm o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, ou L é um grupo amina contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (ou seja, -N (grupo ligante)-), ou L é uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 6 átomos de carbono e contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este.

[000300] Em uma segunda modalidade específica, para citotóxicos dímeros (Ia) ou (IIa), as variáveis são como descrito abaixo:

[000301] W é C=O;

[000302] R₁, R₂, R₁', R₂', R₄, e R₄' são -H;

[000303] um de R₃ ou R₃' é opcionalmente o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este e o outro é -H;

[000304] R₆ é -OMe;

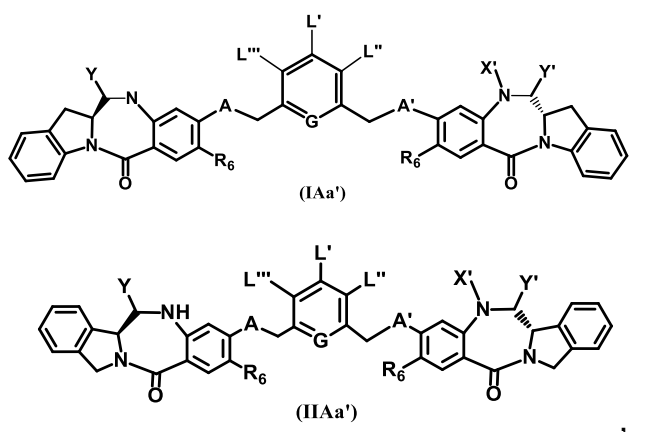
Z e Z' são -CH₂-;

[000305] X' é -H;

[000306] Y' é -H;

[000307] A e A' são -O-; e as demais das variáveis são como descrito na primeira modalidade específica.

[000308] Em uma terceira modalidade específica, os citotóxicos dímeros (ligados ao grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este) de fórmula (Ia') e (IIa') são representados pelas seguintes fórmulas:



em que:

[000309] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina. Preferencialmente, X' é -H, -OH ou -Me. Mais preferencialmente, X' é -H;

[000310] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou -Me. Mais preferencialmente Y' é -H;

[000311] L', L'', e L''' são os mesmos ou diferentes e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma

sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, um sulfonato $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$, um sulfato $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$, uma sulfonamida representada por $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, ciano, um azido, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$, $-\text{OCONR}'\text{R}''$ e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, contanto que somente um de L' , L'' and L''' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Preferencialmente, L' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Alternativamente, um de L' , L'' , ou L''' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, enquanto os outros são $-\text{H}$. Mais preferencialmente, L' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, e L'' e L''' são $-\text{H}$;

[000312] R_6 é $-\text{OR}^c$ ou $-\text{SR}^c$, em que R^c é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono. Preferencialmente, R_6 é $-\text{OMe}$ ou $-\text{SMe}$. Ainda mais preferencialmente, R_6 é $-\text{OMe}$;

[000313] A e A' são selecionados de $-\text{O}-$ e $-\text{S}-$. Preferencialmente, A e A' são $-\text{O}-$;

[000314] R é $-\text{H}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$;

[000315] n é um inteiro de 1 a 24; e,

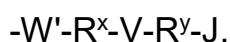
[000316] R^c é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000317] R' e R'' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NRR}^{g'}$, $-\text{COR}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída contendo de 6 a 18 átomos de carbono, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P, um grupo PEG $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, em que n é um inteiro de 1 a 24, preferencialmente n é 2, 4 ou 8; e $\text{R}^{g'}$ é $-\text{H}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente

substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono ou um grupo PEG $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$;

[000318] G é selecionado de -CH- ou -N-; e as demais das variáveis são como descrito na primeira modalidade específica.

[000319] Em uma quarta modalidade específica, para os citotóxicos dímeros de fórmula (IAa') ou (IIAa'), L' é representado para a fórmula:



[000320] em que:

[000321] W' e V são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou selecionado de -CR^eR^{e'}-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-C(=O)O-, -O-C(=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, ou -C(=O)-, ou um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

[000322] R^x e R^y são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aril contendo 6 a 10 átomos de carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionado de O, N ou S;

[000323] R^e e R^{e'} são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR¹⁰¹) ou amino terciário (-NR¹⁰¹R¹⁰²) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R¹⁰¹ e R¹⁰² são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de

carbono; preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000324] n é um inteiro de 1 a 24; e

[000325] J compreende o grupo reativo ligado a este, e é selecionado de um maleimido, um haloacetamido, $-SH$, $-SSR^d$, $-CH_2SH$, $-CH(Me)SH$, $-C(Me)_2SH$, e $-COE$, em que $-COE$ representa um éster reativo selecionado de, entre outros, éster N-hidroxisuccinimida, éster N-hidróxi sulfosuccinimida, éster nitrofenila (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenila), éster dinitrofenila (por exemplo, 2,4-dinitrofenila), éster sulfo-tetrafluorfenila (por exemplo, 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenila), e éster pentafluorfenila, e em que R^{c1} é $-H$ ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, e,

[000326] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenila), dinitrofenila (por exemplo, 2 ou 4-nitrofenila), carboxinitrofenila (por exemplo, 3-carboxi-4-nitrofenila), piridila ou nitropiridila (por exemplo, 4-nitropiridila).

[000327] Preferencialmente, J é $-SH$, $-SSR^d$, um maleimido, ou um éster N-hidroxisuccinimida.

[000328] Preferencialmente, R^e é $-H$ ou $-Me$; R^e é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$; n é um inteiro de 2 a 8; preferencialmente R^k é $-H$, $-Me$ ou $-CH_2CH_2-NMe_2$, e as demais das variáveis são como descrito acima na terceira modalidade específica.

[000329] Em outra modalidade preferencial, V é um aminoácido ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos. Mais preferencialmente, V é valina-citrulina, gly-gly-gly ou ala-leu-ala-leu.

[000330] Em outra modalidade preferencial, W' é $-O-$, $-N(R^e)-$ ou $-N(R^e)-C(=O)-$; R^e é $-H$, uma alquila linear ou ramificada contendo 1

a 4 átomos de carbono, ou $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^k$; R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; V é ausente, $-(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_n\text{-}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{-NH-}$, $-\text{S-}$, $-\text{NH-C}(=\text{O})\text{-}$; R^y é ausente ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e J é $-\text{SH}$, $-\text{SSR}^d$ ou $-\text{COE}$ (preferencialmente, éster N-hidroxisuccinimida). As demais das variáveis é como descrito na quarta modalidade específica.

[000331] Em outra modalidade preferencial, W' é $-\text{O-}$, $-\text{N}(\text{R}^e)\text{-}$ ou $-\text{N}(\text{R}^e)\text{-C}(=\text{O})\text{-}$; R^e é H, $-\text{Me}$, ou $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-Me}$; n é um inteiro de 2 a 6; R^x é alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; V e R^y são ausentes; e J é $-\text{COE}$, preferencialmente éster N-hidroxisuccinimida.

[000332] Em uma quinta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:



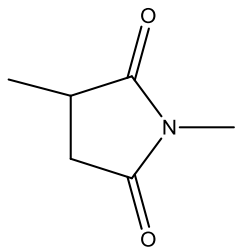
[000333] em que:

[000334] R_1'' , R_2'' , e R_3'' são cada um independentemente $-\text{H}$ ou $-\text{Me}$;

[000335] R_4'' é $-\text{H}$, $-\text{Me}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, ou $-\text{SO}_3\text{-M}^+$, em que M^+ é um cátion farmaceuticamente aceitável;

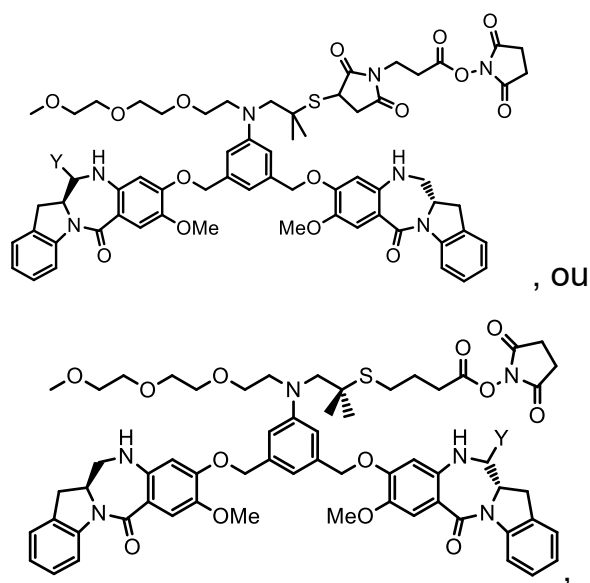
[000336] a é um inteiro de 0-2, b é um inteiro de 0-3; e,

[000337] Cy é um anel heterocíclico de 5 membros opcionalmente substituído contendo um N heteroátomo, preferencialmente Cy é



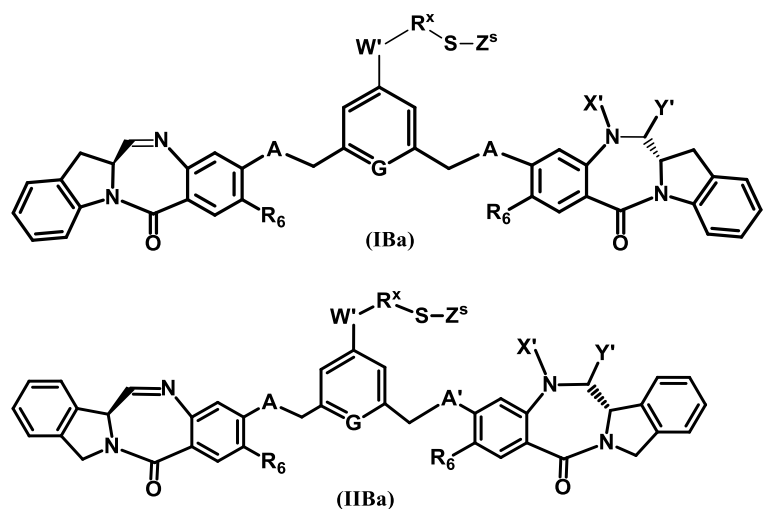
[000338] Em determinadas modalidades, como na quarta ou quinta modalidades específicas, W' é $-\text{N}(\text{R}^e)\text{-}$.

[000339] Em determinadas modalidades, como na quarta ou quinta modalidades específicas, R^e é $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{2-6}\text{-R}^k$, em que R^k é um $-\text{H}$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de



em que Y é -SO₃M, e M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável.

[000346] Em uma oitava modalidade específica, os compostos citotóxicos de fórmula (Ia) e (IIa) são representados pela seguinte fórmulas:



em que:

[000347] W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- ou -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

[000348] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000349] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6

átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amina secundário (por exemplo, -NHR^{101}) ou amina terciária ($\text{-NR}^{101}\text{R}^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquênica ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000350] Z^s é -H , -SR^m ;

[000351] R^m é R^d ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono contendo um éster reativo, selecionados de ésteres N-hidroxisuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, ésteres pentafluorfenila;

[000352] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila ou nitropiridila;

[000353] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como descritos acima na quarta modalidade específica.

[000354] Preferencialmente, R^k é -H ou -Me e n é um inteiro de 2 a 8. Preferencialmente, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e as demais das variáveis são como descrito acima na quinta modalidade específica.

[000355] Em determinadas modalidades, para os compostos de fórmula (IBa) e (IIBa) descritos na oitava modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[000356] X' e Y' são ambos -H ;

[000357] A e A' são ambos -O- ;

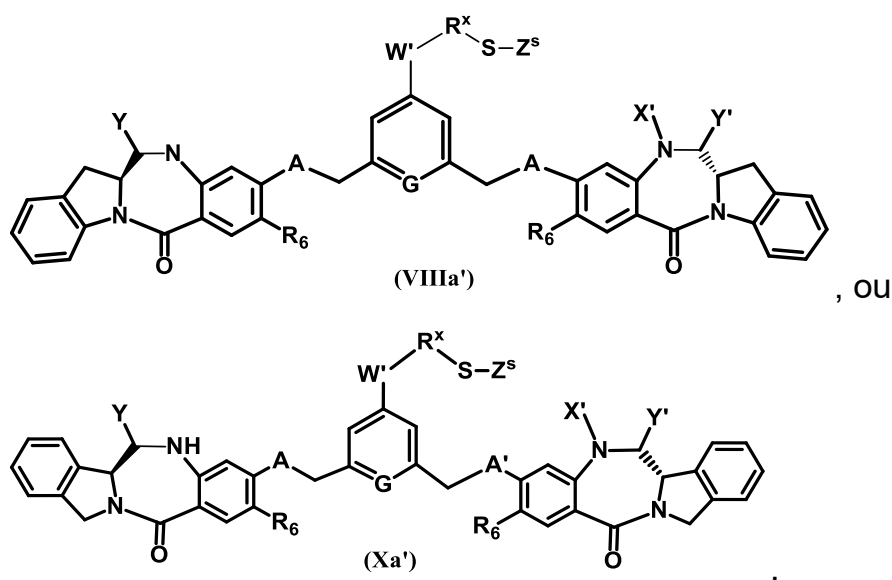
[000358] R_6 é -OMe ;

[000359] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e as demais das variáveis é como descrito acima na oitava

modalidade específica.

[000360] Preferencialmente, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000361] Em uma nona modalidade específica, o composto citotóxico ligado ao grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000362] Y é selecionado de $-SO_3M$, $-SO_2M$ ou $-OSO_3M$;

[000363] M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável como Na^+ ou K^+ ;

[000364] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina;

[000365] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000366] A e A' são selecionados de -O- e -S-;

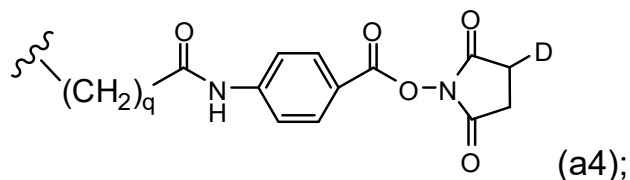
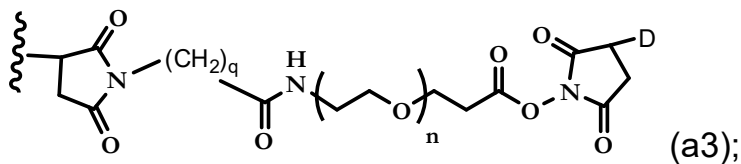
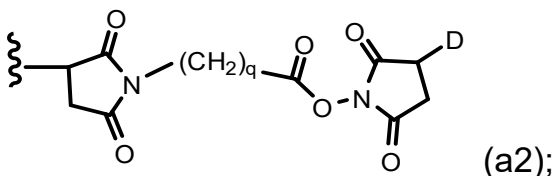
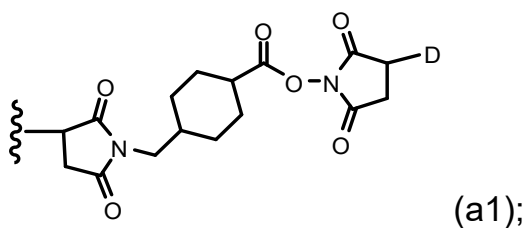
[000367] W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- ou -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

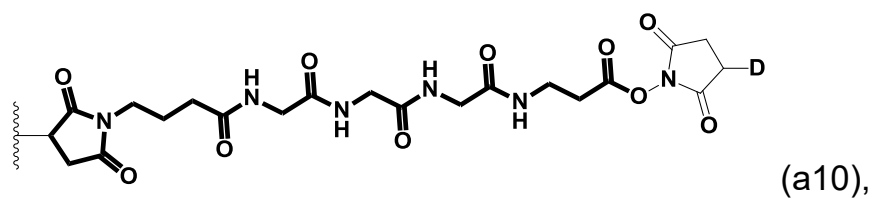
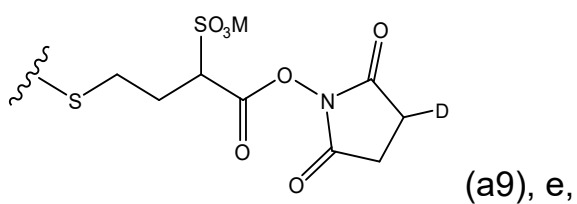
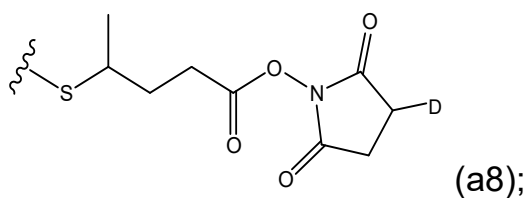
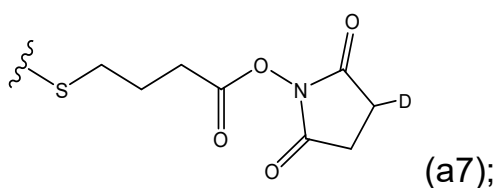
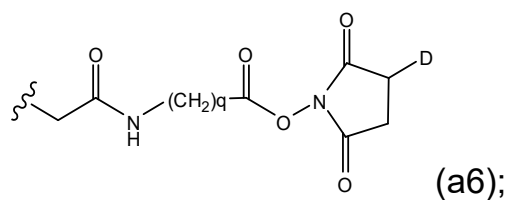
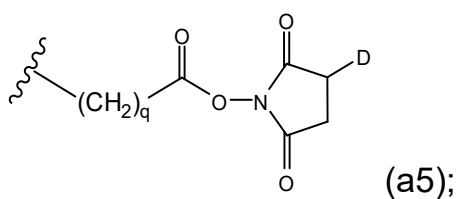
[000368] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000369] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR¹⁰¹) ou amino terciário (-NR¹⁰¹R¹⁰²) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R¹⁰¹ e R¹⁰² são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000370] G é selecionado de -CH- ou -N-;

[000371] Z^s é -H, ou é selecionado de qualquer uma das seguintes fórmulas:





em que:

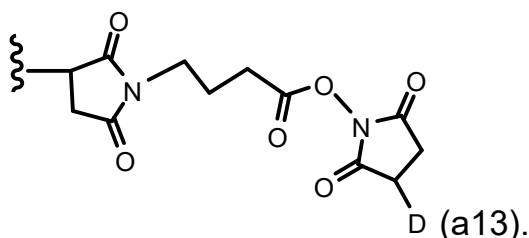
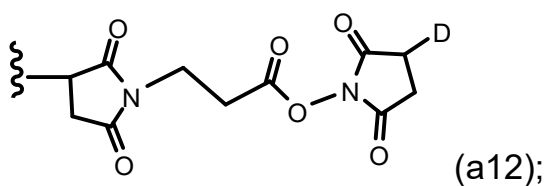
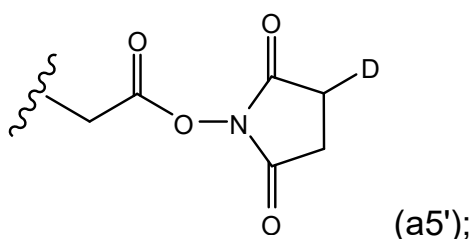
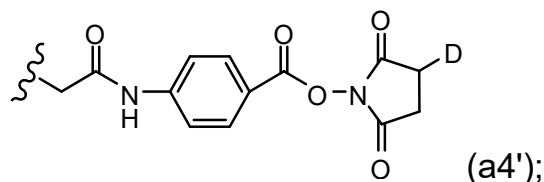
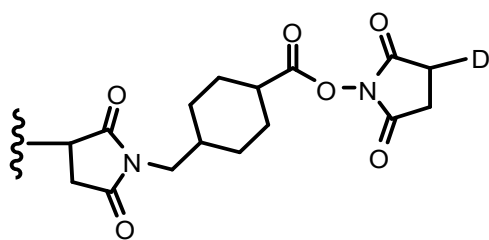
[000372] q é um inteiro de 1 a 5; preferencialmente q é 2;

[000373] n é um inteiro de 2 a 6; preferencialmente n é 4;

[000374] D é -H ou -SO₃M;

[000375] M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável, como Na⁺ ou K⁺.

[000376] Em determinadas modalidades, Z^s é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



[000377] Em determinadas modalidades, como a nona modalidade específica, W' é -N(R^e)-.

[000378] Em determinadas modalidades, R^e é -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000379] Em determinadas modalidades, R^k é -H ou -Me, n é 4, e q é 2.

[000380] Em determinadas modalidades, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000381] Em determinadas modalidades, R^x é -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de -H ou

uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

[000382] Em determinadas modalidades, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000383] Em uma décima modalidade específica, as variáveis da nona modalidade específica são representadas abaixo: Y é $-\text{SO}_3\text{M}$; M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (por exemplo, Na^+); X' e Y' são ambos -H; A e A' são ambos -O-; R_6 é -OMe; e R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000384] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 9ª modalidades específicas, Y é selecionado de $-\text{SO}_3\text{M}$, $-\text{SO}_2\text{M}$ e um sulfato $-\text{OSO}_3\text{M}$. Preferencialmente, Y é $-\text{SO}_3\text{M}$, em que M é preferencialmente -H, Na^+ ou K^+ .

[000385] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, W, quando presente, é C=O.

[000386] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, Z e Z', quando presente, são $-\text{CH}_2-$.

[000387] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, e um grupo de proteção amina. Preferencialmente, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este. Mais preferencialmente, X' é -H.

[000388] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, Y' é -H ou oxo. Mais

preferencialmente, Y' é -H.

[000389] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O-, -S-, -NR₅-, e oxo -(C=O)-. Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-.

[000390] Em qualquer uma das modalidades acima, como a 1ª até a 10ª modalidades específicas, D e D', quando presentes, são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol (-OCH₂CH₂)_n, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que a alquila, alquenila e alquinila são opcionalmente substituídas por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR'. Preferencialmente, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono.

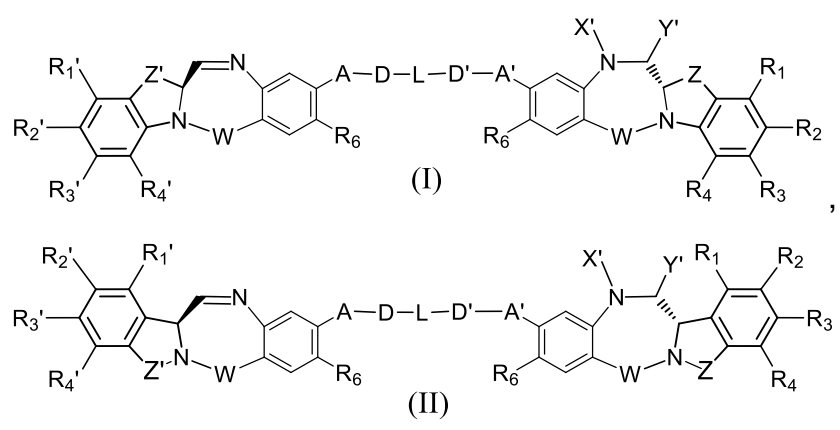
[000391] Em uma décima primeira modalidade específica, os vários grupos dos compostos citotóxicos da primeira, terceira, e nova modalidade específica, são representados abaixo: W é C=O; R₁, R₂, R₁', R₂', R₄ e R₄' são -H; um de R₃, ou R₃' é opcionalmente o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este e o outro é -H; R₆ é -OMe; Z e Z' are -CH₂-; X' é -H; Y' é -H; e A e A' são -O-.

[000392] Em outra modalidade, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este como em qualquer uma das modalidades específicas acima é qualquer um daqueles listados na Lista 1.

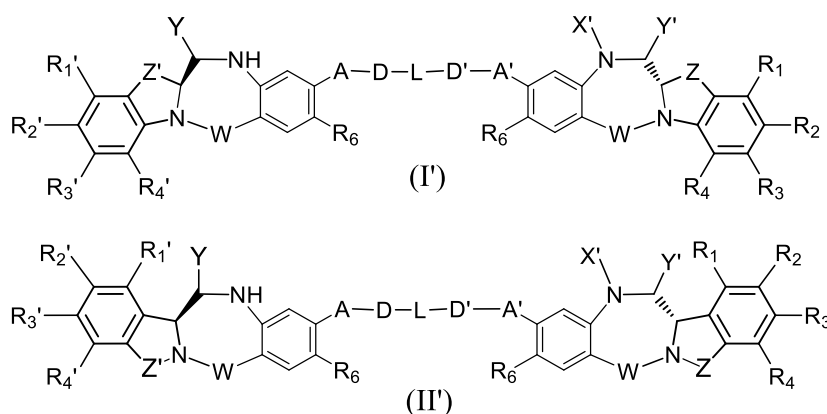
[000393] Em outra modalidade, dímeros citotóxicos sem uma porção ligante (como as porções ligantes descritas acima) ligados a este podem reagir com um reagente de reticulação bifuncional para formar um fármaco contendo uma porção ligante com um grupo reativo ligado a

este, para ser usado nos métodos da presente invenção (por exemplo, para ainda reagir com um agente de ligação à célula para formar o conjugado fármaco-CBA). Alternativamente, dímeros citotóxicos sem uma porção ligante (como as porções ligantes descritas acima) ligados a este podem ainda reagir com um reagente de reticulação bifuncional e um reagente de ligação à célula em uma reação de uma etapa para diretamente formar o conjugado fármaco-CBA. Em qualquer caso, um reagente reativo a imina pode ser adicionado à mistura de reação para formar um aduto reativo de fármaco-reagente (como um aduto bisulfeto) antes da reação para criar o conjugado fármaco-CBA. Preferencialmente, os dímeros citotóxicos sem porções ligantes (como as porções ligantes descritas acima) ligados a este pode ser primeiro pré-incubados com o reagente reativo imina para formar o aduto, antes de a mistura de reação ser usada nas reações subsequentes para formar o conjugado fármaco-CBA.

[000394] Assim na décima segunda modalidade específica, o composto citotóxico contendo imina é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



e, após reagir com o reagente reativo imina, o composto citotóxico é representado pela seguinte fórmula, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



em que:

[000395] Y é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'})$ ($\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, e $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é aduto de um bissulfito, um hidrosulfito, ou metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal sódio);

[000396] X' é selecionado do grupo que consiste em $-\text{H}$, $-\text{OH}$, um

grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono (por exemplo, fenila), um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P. Preferencialmente, X' é -H, -OH, ou -Me. Mais preferencialmente, X' é -H;

[000397] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos. Preferencialmente, Y' é selecionado de -H ou oxo. Mais preferencialmente, Y' é -H;

[000398] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000399] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' , e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida

representada por $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, ciano, um azido, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$, e $-\text{OCONR}'\text{R}''$. Preferencialmente, 1, 2, 3, ou todos de R_2 , R_3 , R_2' e R_3' é -H;

[000400] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável;

[000401] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000402] R' e R'' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, $-\text{NR}_2$, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, e um anel opcionalmente substituído 3 a 18 membros heterocíclico contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000403] n é um inteiro de 1 a 24;

[000404] W é selecionado de C=O, C=S, CH_2 , BH, SO, e SO_2 ;

[000405] R_6 é -H, -R, -OR, -SR, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, halogênio, $-\text{OR}^c$ ou $-\text{SR}^c$; preferencialmente, R_6 é -OMe ou -SMe. Ainda mais preferencialmente, R_6 é -OMe;

[000406] Z e Z' são independentemente selecionados de $-(\text{CH}_2)_{n'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{CR}_7\text{R}_8-(\text{CH}_2)_{na'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NR}_9-(\text{CH}_2)_{na'}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{na'}$ e $-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{S}-(\text{CH}_2)_{na'}$;

[000407] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de

0, 1, 2 e 3;

[000408] R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000409] R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

[000410] A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- e -CRR'N(R_5)-. Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-;

[000411] R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000412] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

[000413] L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, e é uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila,

alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída.

[000414] Estruturas representativas de ditos compostos citotóxicos contendo imina são mostradas na tabela 15. Ver compostos 1, 3, 4, 5, e 1d.

[000415] Em determinadas modalidades,

[000416] W é C=O;

[000417] R₁, R₂, R₃, R₄, R_{1'}, R_{2'}, R_{3'}, e R_{4'} são -H;

[000418] Z e Z' são -CH₂-;

[000419] A e A' são ambos -O-;

[000420] W é -(C=O)-;

[000421] G é -CH-;

[000422] R₆ é -H, ou opcionalmente substituído C1-C10 linear, C1-C10 ramificado, ou C3-C7 alquila cíclica, -O-alquila, ou -O-halo-alquila, como -OMe;

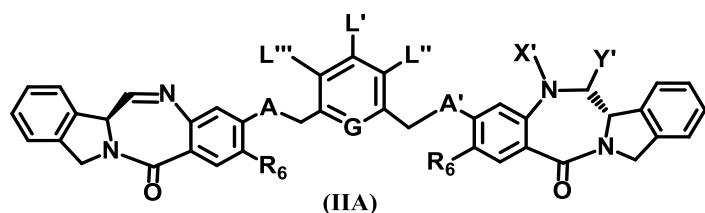
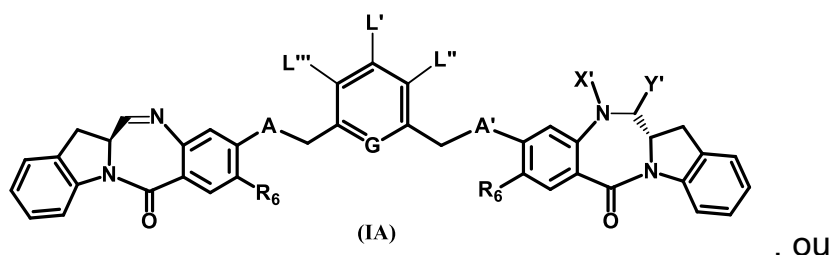
[000423] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina; e

[000424] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono.

[000425] Preferencialmente, Y é selecionado de -SO₃M, -SO₂M, ou -OSO₃M, e em que M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável como Na⁺ ou K⁺.

[000426] Preferencialmente, Y é -SO₃M; M é -H ou Na⁺.

[000427] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico contendo imina é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



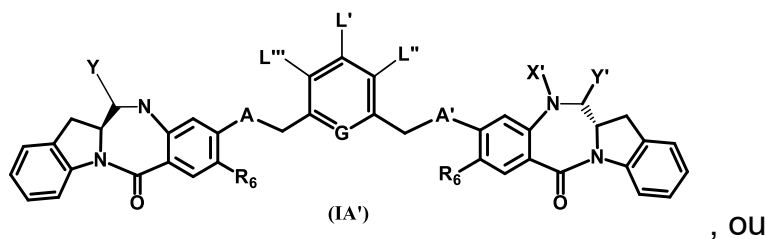
[000428] em que:

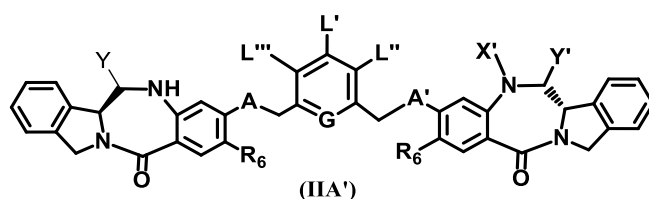
[000429] L', L'', e L''' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃M, um sulfato -OSO₃M, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

[000430] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável; e,

[000431] G é selecionado de -CH- ou -N-.

[000432] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico, quando presente, é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:

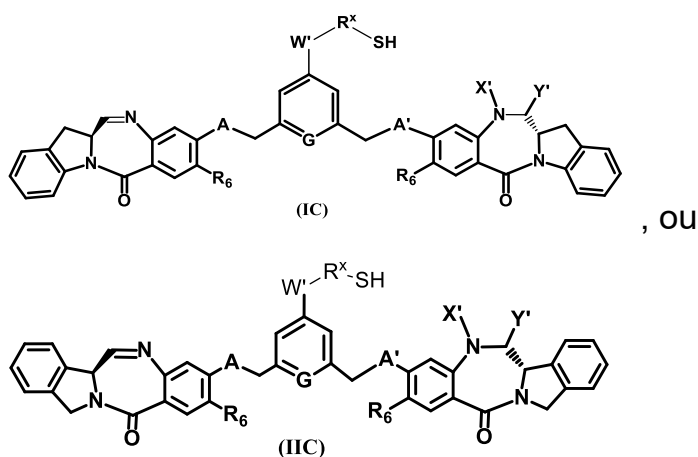




[000433] Em determinadas modalidades, um de L', L'', ou L''' contém o grupo tiol, enquanto os outros são -H. Preferencialmente, L' contém o grupo tiol, e L'' e L''' são -H.

[000434] Em determinadas modalidades, A e A' são ambos -O-; R₆ é -OMe; e G é -CH-.

[000435] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico contendo imina pode ser representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000436] W' é ausente, ou quando presente, é selecionado de -CR^eR^{e'}-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, ou -C(=O)-, ou um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

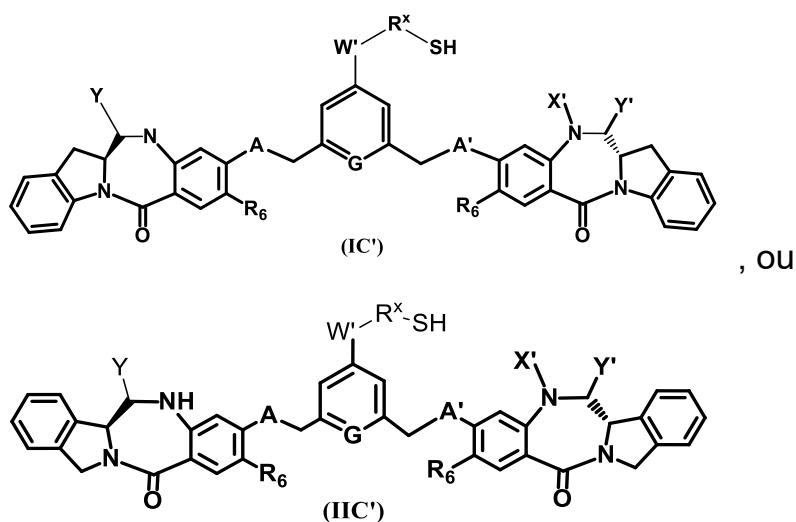
[000437] R^x é ausente, ou quando presente, é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aril contendo 6 a 10 átomos de

carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionado de O, N ou S;

[000438] R^e e $R^{e'}$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono; preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000439] n é um inteiro de 1 a 24.

[000440] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico, quando presente, pode ser representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas:



[000441] Em determinadas modalidades,

[000442] Y é selecionado de $-SO_3M$, $-SO_2M$ ou $-OSO_3M$;

[000443] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável como Na^+

ou K^+ ;

[000444] X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina;

[000445] Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000446] A e A' são selecionados de -O- e -S-;

[000447] W' é ausente ou selecionado de -O-, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, -S- ou $-CH_2-S-$, $-CH_2NR^e-$;

[000448] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000449] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (por exemplo, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000450] G é selecionado de -CH- ou -N-.

[000451] Em determinadas modalidades, W' é $-N(R^e)-$.

[000452] Em determinadas modalidades, R^e é $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000453] Em determinadas modalidades, R^k é -H ou -Me, n é 4, e q é 2.

[000454] Em determinadas modalidades, R^x é uma alquila linear ou

ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000455] Em determinadas modalidades, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

[000456] Em determinadas modalidades, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000457] Em determinadas modalidades,

[000458] Y é $-SO_3M$, $-SO_2M$, ou um sulfato $-OSO_3M$; preferencialmente $-SO_3M$;

[000459] M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável (por exemplo, Na^+);

[000460] X' e Y' são ambos -H;

[000461] A e A' são ambos -O-;

[000462] R_6 é -OMe; e

[000463] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

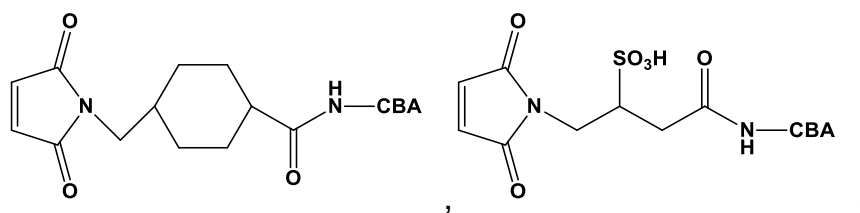
[000464] Em determinadas modalidades, o agente de ligação cruzada bifuncional é:

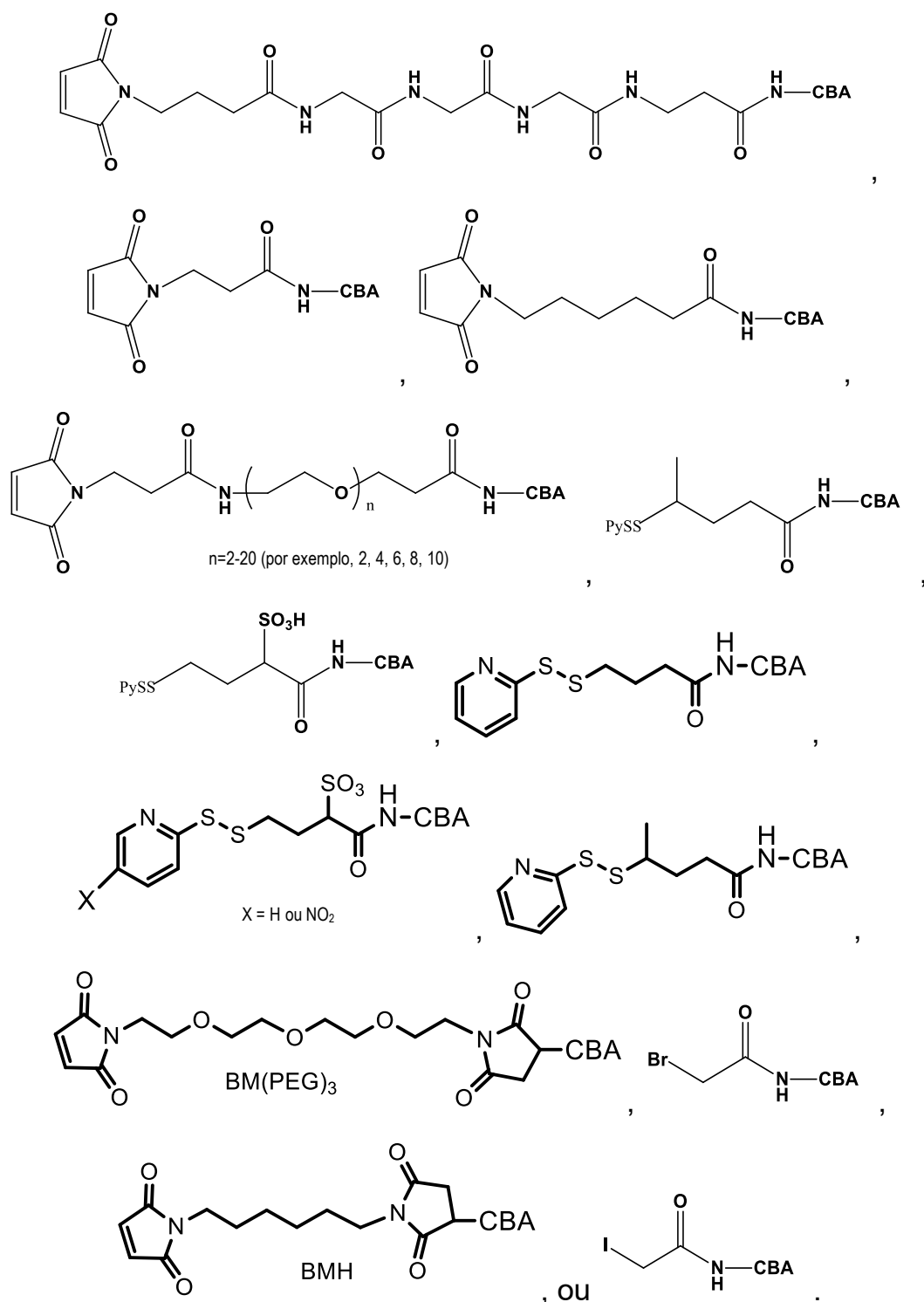
[000465] uma porção a base de maleimido selecionada de: N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster N-succinimidila de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidila de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimida de ácido ε -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster N-(α -maleimidoacetóxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-

ditio)butanoato; ou, uma porção a base de haloacetila selecionada de: N-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), Iodoacetato de N-succinimidila (SIA), Bromoacetato de N-succinimidila (SBA), e N-succinimidil-3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(β-maleimidopropilóxi)succinimida éster (BMPS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico hidrazida•HCl (MPBH), Succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), éster N-(γ-maleimidobutirilóxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBS), éster N-(ε-maleimidocaproilóxi)sulfosuccinimido (sulfo-EMCS), éster N-(κ-maleimidoundecanoilóxi)sulfosuccinimida (sulfo-KMUS), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB), CX1-1, sulfo-Mal e PEG_n-Mal.

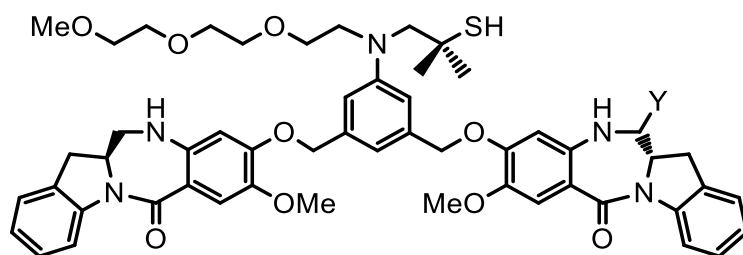
[000466] Em determinadas modalidades, o agente de ligação cruzada bifuncional é selecionado do grupo que consiste em SMCC, Sulfo-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, bis-maleimidohexano ou BMPEO.

[000467] Em determinadas modalidades, o CBA modificado, quando presente, é:





[000468] Em uma décima terceira modalidade específica, o composto citotóxico contendo imina é:



[000469] Os agentes de reticulação bifuncionais podem ser qualquer ligante bifuncional conhecido na técnica. Por exemplo, os ligantes bifuncionais podem ser usados para preparar os compostos fármaco-ligante são aqueles que formam ligações dissulfeto, ligações tioéter, ligações lábeis a ácido, ligações fotolábeis, ligações lábeis a peptidase e ligações lábeis a esterase com os compostos citotóxicos (ver por exemplo, Patente US 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073, todos dos quais são incorporados aqui por referência). Preferencialmente, os agentes de reticulação bifuncionais são aqueles que formam ligações dissulfeto, ligações lábeis a tioéter e peptidase com os compostos citotóxicos. Outros agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados na presente invenção incluem ligantes não cliváveis, como aqueles descritos no número de publicação US 2005/0169933, ou ligantes carregados ou ligantes hidrofílicos e são descritos em US 2009/0274713, US 2010/01293140 e WO 2009/134976, cada um dos quais é expressamente incorporado aqui por referência. Os agentes de reticulação bifuncionais que podem ser usados para preparar os compostos fármaco-ligante da presente invenção ainda incluem aqueles descritos em *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*, o ensinamento inteiro do qual é incorporado aqui por referência.

[000470] Em outra modalidade preferencial, o fármaco (com ou sem um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este) que pode ser usado na presente invenção é qualquer um de compostos mostrados nas tabelas 1-7. Em outra modalidade preferencial, o agente de ligação

ao conjugado célula-fármaco que pode ser feito pela presente invenção é qualquer um dos conjugados mostrados na tabela 8.

Tabela 1. Estruturas de compostos representativos na presente invenção.

<p>Notas:</p> <p>n = 1 ou 3</p> <p>m = 3 ou 4</p> <p>W = OH, OMe, ONHS, NHNH₂, H, Me, Ph, Peptídeo</p> <p>X = CH₂, O, S, NH ou NMe</p> <p>Y = CH₂ ou ausente</p> <p>Z'' = H, Me, SMe, S(CH₂)₃C(O)NHS ou CH₂C(O)NHS ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO₂</p>	

Tabela 2. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (continuação).

<p>Nota:</p> <p>n = 1, 2 ou 3</p> <p>m = 3 ou 4</p> <p>W = OH, OMe, ONHS, NHNH₂, H, Me, Ph, Peptídeo</p> <p>X = CH₂, O, S, NH, NMe</p> <p>Y = ausente ou CH₂</p> <p>Z = CH ou N</p> <p>Z'' = H, Me, SMe, S(CH₂)₃C(O)NHS ou CH₂C(O)NHS ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO₂</p>	

Tabela 3. Estruturas de compostos representativos na presente

invenção (Continuação).

<p>Nota:</p> <p>n = 1, 2 ou 3</p> <p>m = 3 ou 4</p> <p>W = OH, OMe, ONHS, NHNH₂, H, Me, Ph, Peptídeo</p> <p>X = CH₂, O, S, NH, NMe</p> <p>Z = CH ou N</p> <p>Z'' = H, Me, SMe, S(CH₂)₃C(O)NHS ou CH₂C(O)NHS ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO₂</p>	

Tabela 4. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

Nota:

n = 1, 2 ou 3

m = 3 ou 4

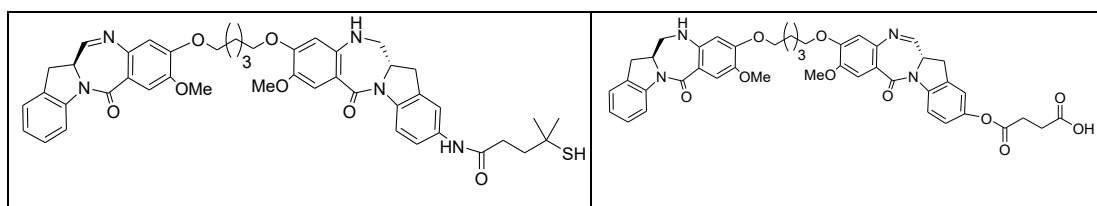
W = OH, OMe, ONHS, NHNH₂, H, Me, Ph, Peptídeo

X = CH₂, O, S, NH, NMe

Z = CH ou N

Z'' = H, Me, SMe, S(CH₂)₃C(O)NHS ou CH₂C(O)NHS ou BMPS ou SMCC ou SPy ou SPy-NO₂

Tabela 5. Estruturas de compostos representativos na presente invenção.



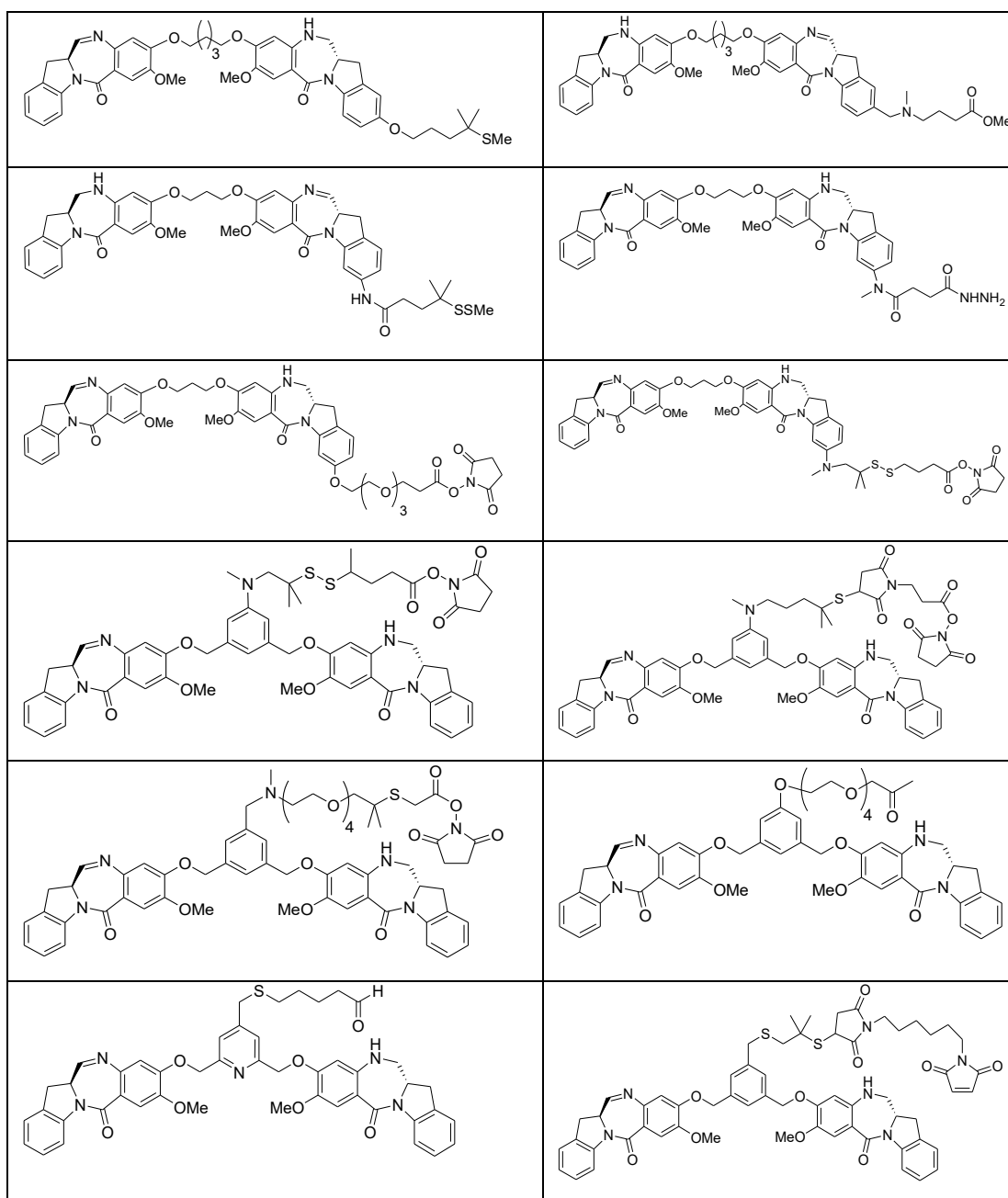
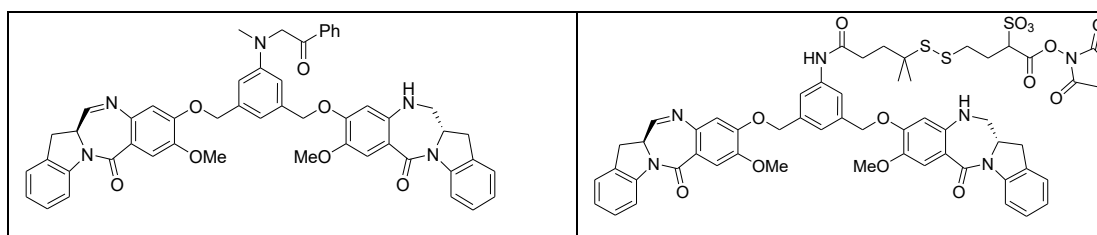


Tabela 6. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).



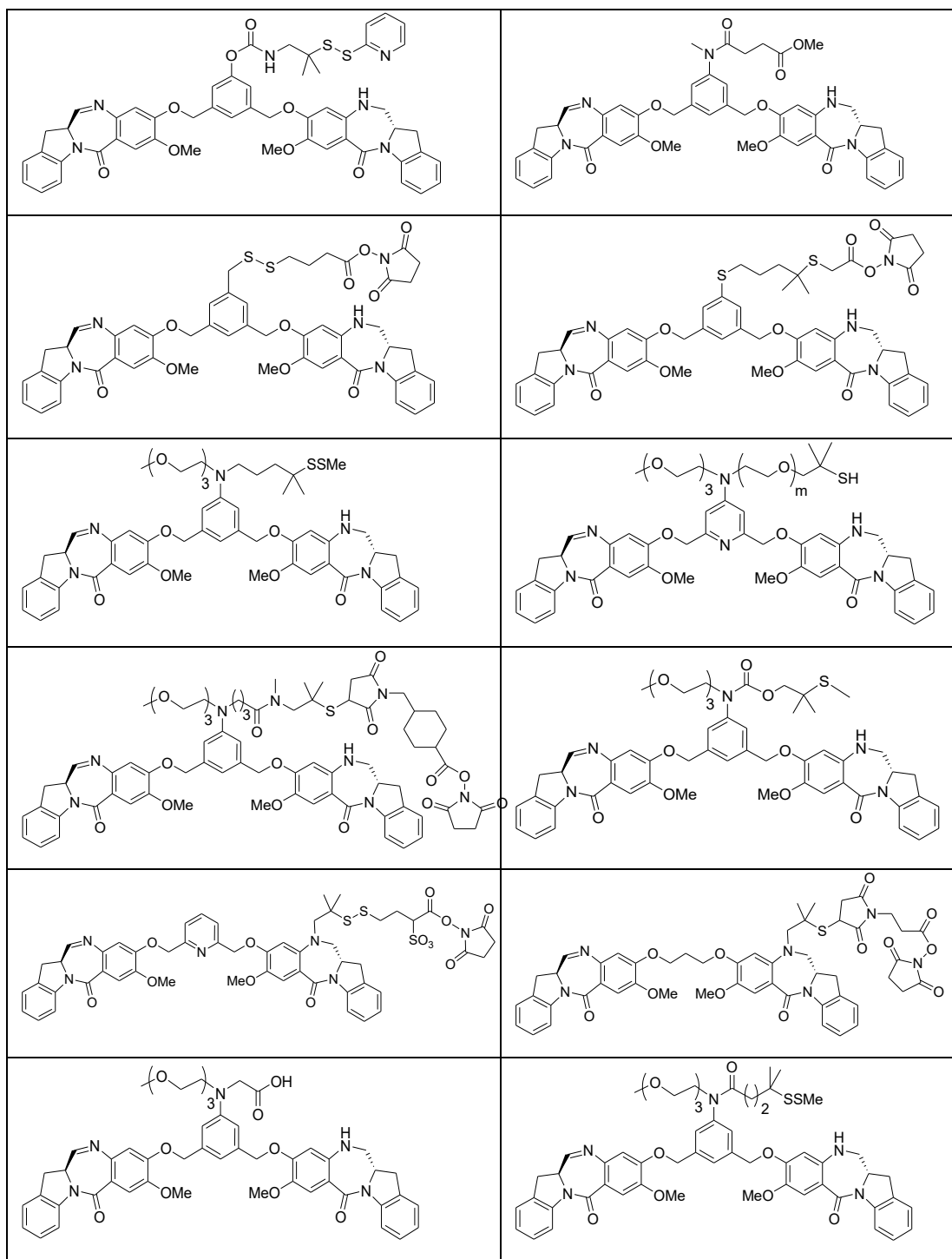


Tabela 7. Estruturas de compostos representativos na presente invenção (Continuação).

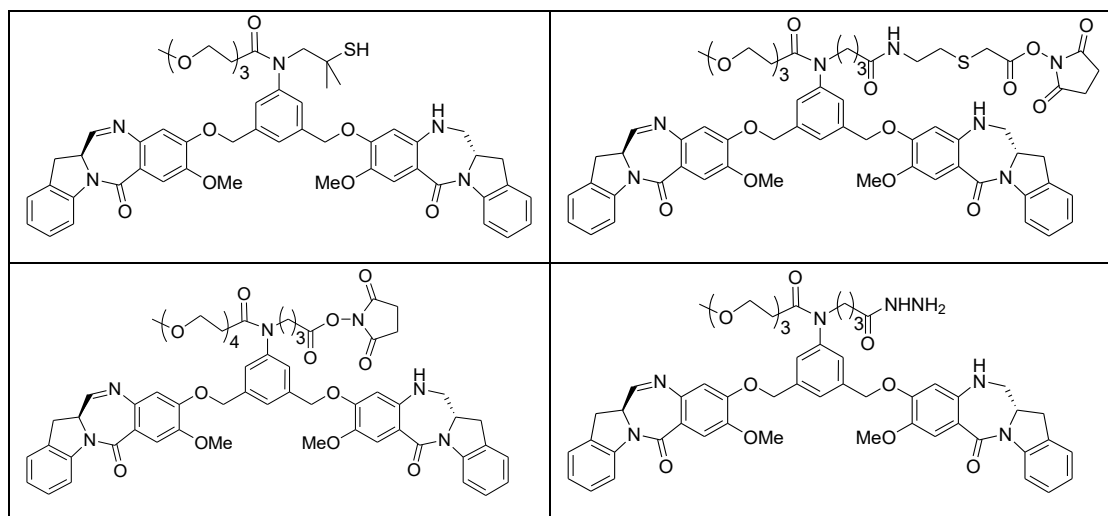
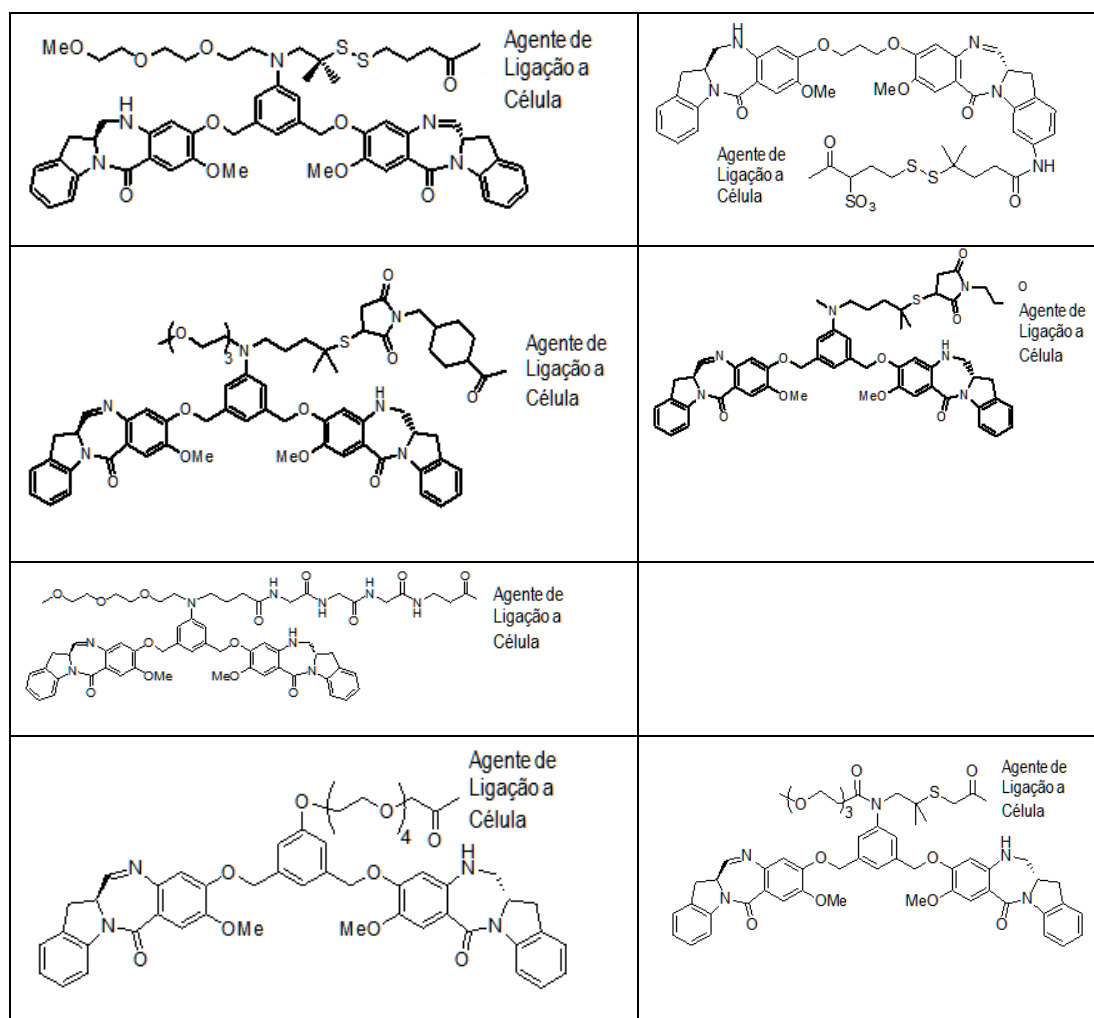
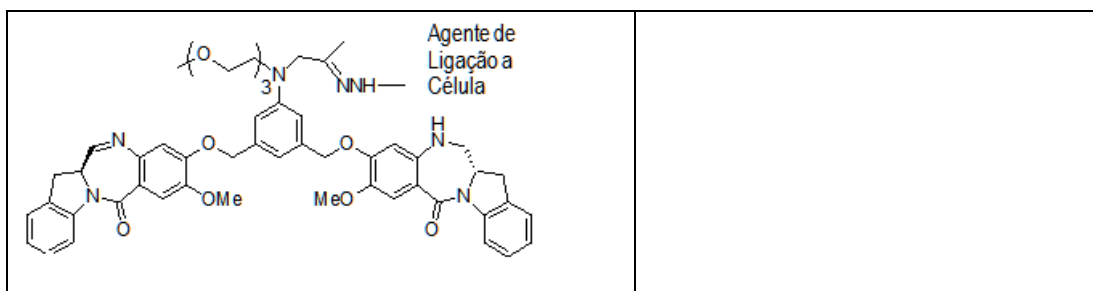


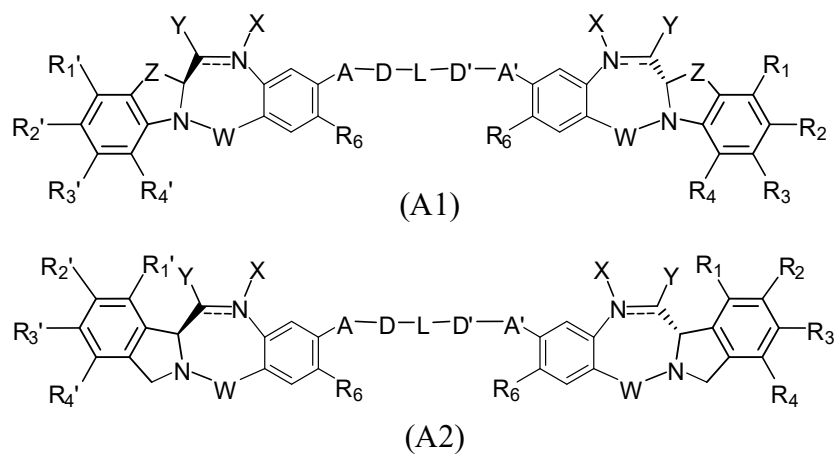
Tabela 8. Estruturas de conjugados representativos da presente invenção.





[000471] Em qualquer um dos compostos ou conjugados descritos acima nas tabelas 1-8, a ligação dupla de imina pode reagir com/ter reagido com qualquer reagente reativo a imina (como aqueles descritos aqui) de acordo com os métodos da invenção para formar adutos, incluindo adutos bissulfitos. Ditos adutos imina-protegidos nos compostos das tabelas 1-7 podem ser usados em outras reações de acordo com os métodos da invenção para produzir conjugados da invenção. De modo semelhante, compostos compreendendo adutos imina-protegidos podem ser usados nos métodos da invenção para produzir os conjugados na tabela 8.

[000472] Em outra modalidade, fármacos opcionalmente contendo uma porção ligante (por exemplo, um grupo ligante com um grupo reativo ligado a este) que pode ser usado nos métodos da presente invenção são representados por fórmula (A1) ou (A2):



em que:

[000473] a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, contanto que pelo menos um de = entre N e C

represente uma ligação dupla, e quando é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, e quando é uma ligação simples, X é -H ou uma porção protetora amina que converte o composto no profármaco; preferencialmente, quando é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, e a ligação dupla pode reagir com o reagente imina-reativo da invenção para formar um aduto (como um aduto bissulfito) antes do aduto ser usado nos métodos da invenção para produzir conjugados fármaco-CBA;

[000474] Y é selecionado de -H, -OR, um éster representado por -OCOR', um carbonato representado por -OCOOR', um carbamato representado por -OCONR'R", uma amina ou hidroxil amina representado por -NR'R", amida representado por -NRCOR', um peptídeo representado por -NRCOP, em que P é um aminoácido ou um polipeptídeo contendo entre 2 a 20 unidades de aminoácido, um tioéter representado por -SR', um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfito -SO₃, um bissulfito -OSO₃, -SO₂M, -SO₃M, -OSO₃M, um halogênio, ciano, um azido, ou um tiol; em que M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável (como Na⁺); ou,

[000475] Y é um sulfito (HSO₃, HSO₂ ou um sal de HSO₃⁻, SO₃²⁻ ou HSO₂⁻ formado com um cátion), metabissulfito (H₂S₂O₅ ou um sal de S₂O₅²⁻ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO₃SH₃, PO₂S₂H₂, POS₃H₂, PS₄H₂ ou um sal de PO₃S³⁻, PO₂S₂³⁻, POS₃³⁻ ou PS₄³⁻ formado com um cátion), éster tiofosfato (RⁱO)₂PS(ORⁱ), RⁱS-, RⁱSO, RⁱSO₂, RⁱSO₃, tiosulfato (HS₂O₃ ou um sal de S₂O₃²⁻ formado com um cátion), ditionito (HS₂O₄ ou um sal de S₂O₄²⁻ formado com um cátion), fosforoditioato (P(=S)(OR^k)(S)(OH) ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico (R^kC(=O)NOH ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato (HOCH₂SO₂⁻ ou um sal de HOCH₂SO₂⁻ formado com um cátion, como HOCH₂SO₂⁻Na⁺) ou uma mistura dos mesmos, em que Rⁱ é uma alquila linear ou

ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^i)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $R^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila;

[000476] R , R' , e R'' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de $-H$, alquila, alquenila ou alquinila substituída ou não substituída linear, ramificado ou cíclico contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20), um anel de 5 ou 6 membros heteroaril contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um sistema de anel fundido de 5 a 18 membros, em que pelo menos um dos anéis é aromático, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, aril contendo de 6 a 18 átomos de carbono, 3- to 18-membered anel heterocíclico contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P, em que the substituinte é selecionado de halogênio, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, $-NRCOR'$, $-SR_{10}$, um sulfóxido representado por $-SOR'$, uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfito $-SO_3$, um bissulfito $-OSO_3$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NRR'$, ciano, um azido, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ ou $-OCONR_{11}R_{12}$;

[000477] R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} and R_{12} são cada um independentemente selecionados de $-H$, alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20), um anel 5 ou 6 membros heteroaril contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados

de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um sistema de anel fundido de 5-18 membros, em que pelo menos um dos anéis é aromático, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, aril contendo de 6 a 18 átomos de carbono, anel heterocíclico de 3 a 10 membros contendo 3 a 18 membros no anel heterocíclico contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P, e R_{10} é opcionalmente SR_{13} ou COR_{13} ;

[000478] R_{13} é selecionado de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, um anel heteroarila de 5 ou 6 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um sistema de anel fundido de 5-18 membros, em que pelo menos um dos anéis é aromático, contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, aril contendo de 6 a 18 átomos de carbono, 3 a 18 membros no anel heterocíclico contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P, opcionalmente R_{11} é OR_{14} , em que R_{14} tem a mesma definição que R , opcionalmente R'' é -OH;

W é $C=O$, $C=S$, CH_2 , BH , SO ou SO_2 ;

[000479] R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' , e R_4' são cada um independentemente selecionados de -H, alquila, alquenila ou alquinila substituída ou não substituída linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20), ou a substituinte selecionados de um halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, $-NRCOR'$, $-SR_{10}$, um sulfóxido representado por $-SOR'$, uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfito $-SO_3$, um bissulfito $-OSO_3$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NRR'$, ciano, um azido, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ ou $-OCONR_{11}R_{12}$, em que R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} e R_{12} são como definido acima,

opcionalmente, qualquer um de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' , ou R_4' é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (se presente), que pode ser selecionados de uma unidade polipirrolo, poli-indolila, poliimidazolila, polipirrolo-imidazolila, poli-pirrollo-indolila ou poliimidazolo-indolil opcionalmente contendo o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este;

[000480] Z é selecionado de $-(CH_2)_n-$, em que n é 1, 2 ou 3, $-CR_{15}R_{16}$, $-NR_{17}$, $-O-$ ou $-S-$, em que R_{15} , R_{16} e R_{17} são cada um independentemente selecionados de $-H$, linear, ramificado ou alquila cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $(-OCH_2CH_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20);

[000481] R_6 é $-OR$, $-SR$ ou $-NRR'$, em que R e R' têm a mesma definição conferida acima, opcionalmente R_6 é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (se presente);

[000482] X' é selecionado de $-CH_2$, $-NR$, $-CO$, $-BH$, $-SO$ ou $-SO_2$ em que R tem a mesma definição conferida acima;

[000483] Y' é $-O-$, $-CH_2-$, $-NR$ ou $-S$, em que R tem a mesma definição conferida acima;

[000484] Z' é $-CH_2$ ou $-(CH_2)_n$, em que n é 2, 3 ou 4, contanto que X' , Y' e Z' não são todos CH_2 ao mesmo tempo;

[000485] A e A' são os mesmos ou diferentes e são selecionados de $-O-$, $-CRR'O$, S , $-CRR'S$, $-NR_{15}$ ou $-CRR'NHR_{15}$, em que R e R' têm a mesma definição conferida acima e em que R_{15} tem a mesma definição que R;

[000486] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente substituído por qualquer um de halogênio, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, $-NRCOR'$, $-SR_{10}$, um sulfóxido representado por $-SOR'$, uma

sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, um sulfito $-\text{SO}_3$, um bissulfito $-\text{OSO}_3$, uma sulfonamida representada por $-\text{SO}_2\text{NRR}'$, ciano, um azido, $-\text{COR}_{11}$, $-\text{OCOR}_{11}$ ou $-\text{CONR}_{11}\text{R}_{12}$, em que as definições de R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} e R_{12} são como definido acima, ou uma unidade de polietilenoglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20);

[000487] L é um grupo fenila opcional ou 3 a 18 membros no anel heterocíclico contendo 1 a 6 heteroátomos selecionado de O, S, N e P que é opcionalmente substituído, em que o substituinte é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este (se presente), ou é selecionado de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente substituído por qualquer um de halogênio, $-\text{OR}_7$, $-\text{NR}_8\text{R}_9$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NRCOR}'$, $-\text{SR}_{10}$, um sulfóxido representado por $-\text{SOR}'$, uma sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, um sulfito $-\text{SO}_3$, um bissulfito $-\text{OSO}_3$, uma sulfonamida representada por $-\text{SO}_2\text{NRR}'$, ciano, um azido, $-\text{COR}_{11}$, OCOR_{11} ou $\text{CONR}_{11}\text{R}_{12}$, em que R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} e R_{12} têm as mesmas definições conferida acima, uma unidade de polietilenoglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200, ou 1-20); opcionalmente, L próprio é o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; ou seis solvatos, sais, hidratos ou sais hidratados, seus isômeros ópticos, racematos, diastereoisômeros, enantiômeros ou as estruturas cristalinas polimórficas farmaceuticamente aceitáveis destes compostos; contanto que o composto tem não mais do que um grupo ligante com o grupo reativo ligado a este.

[000488] Em uma modalidade preferencial, para os fármacos de fórmula (A1) ou (A2):

[000489] a linha dupla \equiv entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, contanto que quando uma ligação dupla X é

ausente e Y é -H, e quando é uma ligação simples, X é -H ou um grupo amina protetor que converte o composto na profármaco;

[000490] Y é selecionado de -H, -OR, NR'R", um sulfito -SO₃M, ou um bissulfito -OSO₃M, em que M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável (como Na⁺);

[000491] R é selecionado de -H, alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol (-OCH₂CH₂)_n, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200 ou 1-20), arila contendo de 6 a 10 átomos de carbono, anel heterocíclico contendo de 3 a 10 átomos de carbono;

[000492] W é C=O, CH₂ ou SO₂;

[000493] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' e R₄' são cada um independentemente selecionados de -H, -NO₂ ou o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente);

[000494] R₆ é -OR₁₈, em que R₁₈ tem a mesma definição que R;

[000495] Z é selecionado de -(CH₂)_n, em que n é 1, 2 ou 3, -CR₁₅R₁₆, -NR₁₇, -O- ou -S-, em que R₁₅, R₁₆ and R₁₇ são cada um independentemente selecionados de -H, linear, ramificado ou alquil cíclico contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol (-OCH₂CH₂)_n, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200 ou 1-20);

[000496] X' é selecionado de -CH₂, ou C=O;

[000497] Y' é -O-, -NR, ou -S, em que R é definido como acima;

[000498] Z' é -CH₂- ou -(CH₂)₂-;

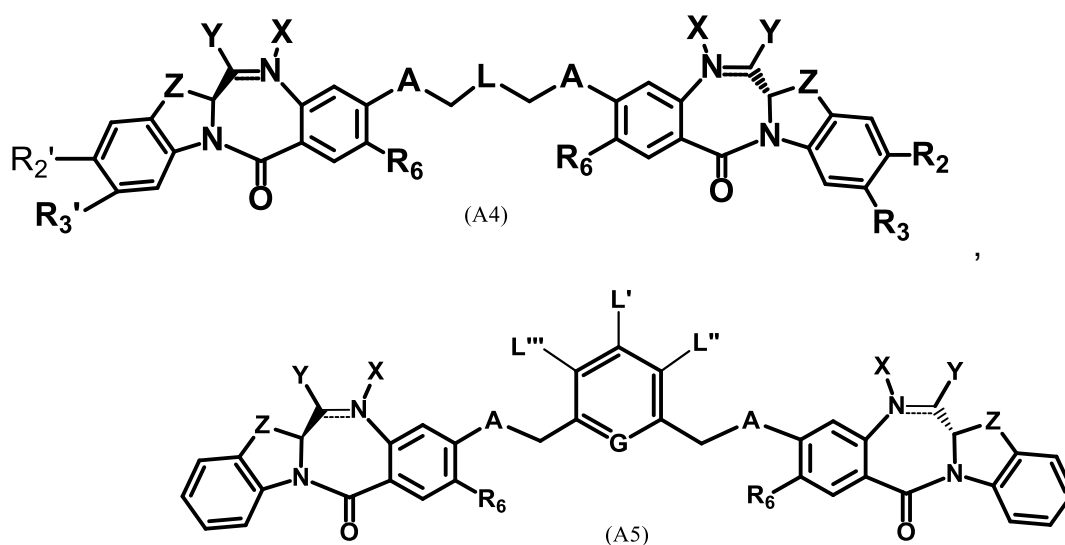
[000499] A e A' são cada um -O-;

[000500] D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000501] L é um grupo fenila opcional ou um anel heterociclo contendo

de 3 a 10 átomos de carbono que é opcionalmente substituído, em que o substituinte é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente), ou é selecionado de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente substituído por qualquer um de halogênio, $-OR_7$, $-NR_8R_9$, $-NO_2$, $-NRCOR'$, $-SR_{10}$, um sulfóxido representado por $-SOR'$, uma sulfona representada por $-SO_2R'$, um sulfito $-SO_3$, um bissulfito $-OSO_3$, uma sulfonamida representada por $-SO_2NRR'$, ciano, um azido, $-COR_{11}$, $-OCOR_{11}$ ou $-OCONR_{11}R_{12}$, uma unidade de polietilenoglicol ($-OCH_2CH_2$)_n, em que n é um inteiro de 1 a 2000 (preferencialmente 1-200 ou 1-20); opcionalmente, L próprio é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este; ou seus solvatos, sais, hidratos ou sais hidratados, seus isômeros ópticos, racematos, diastereoisômeros, enantiômeros ou as estruturas cristalinas polimórficas farmaceuticamente aceitáveis destes compostos.

[000502] Em outra modalidade preferencial, o fármaco de fórmula (A1) ou (A2) é representada por compostos de fórmulas (A4) ou (A5):



[000503] em que:

[000504] a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, contanto que quando é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, e quando é uma ligação simples, X é -H ou um grupo amina protetor que converte o composto na profármaco;

[000505] Y é selecionado de -H, -OH, um éter representado por -OR, -NR'R", um sulfito -SO₃M, ou um bissulfito -OSO₃M;

[000506] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (como Na⁺);

[000507] R, R', e R" são selecionados de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000508] um de R₂, R₃, R₂' e R₃' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente) e os outros são -H, -NRCOR' ou -NO₂;

[000509] R₆ é -OR, em que R tem a mesma definição como acima;

[000510] Z é -CH₂- ou -NR, em que R tem a mesma definição como acima;

[000511] A é -O- ou -NR₁₅;

[000512] L é -(CH₂)_{nn}-, em que nn é 0 ou um inteiro entre 1 e 5, ou uma alquila ou alquenila substituída ou não substituída contendo de 2 a 4 átomos de carbono, em que o substituinte é selecionado de halogênio, -OR₇, -NR₈R₉, -NO₂, -NRCOR', -SR₁₀, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfito -SO₃, um bissulfito -OSO₃, uma sulfonamida representada por -SO₂NRR', ciano, um azido, -COR₁₁, -OCOR₁₁, ou -OCONR₁₁R₁₂;

[000513] R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ e R₁₅ tem a mesma definição conferida acima;

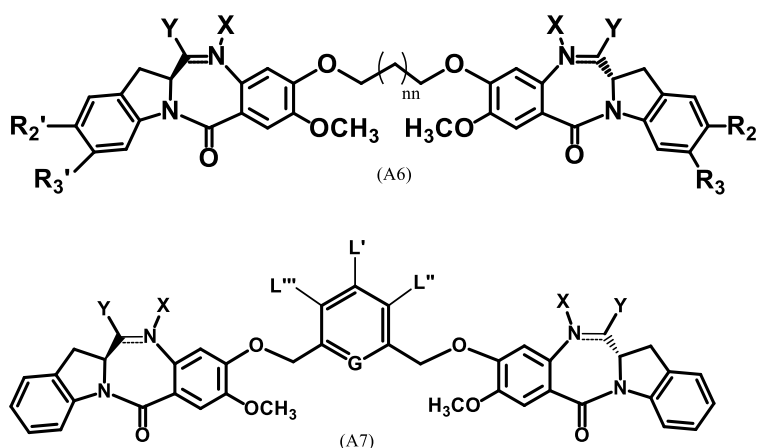
[000514] opcionalmente, L próprio é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente);

[000515] um de L', L", ou L''' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente), enquanto os outros são -H;

preferencialmente L' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente); e

[000516] G é -CH- ou -N-, ou seus solvatos, sais, hidratos ou sais hidratados, seus isômeros ópticos, racematos, diastereoisômeros, enantiômeros ou as estruturas cristalinas polimórficas farmaceuticamente aceitáveis destes compostos.

[000517] Ainda em outra modalidade preferencial, o composto de fórmula (A1) ou (A2) é representado por compostos de fórmulas das fórmulas (A6) ou (A7):



[000518] em que:

[000519] a linha dupla = entre N e C representa uma ligação simples ou uma ligação dupla, contanto que quando é uma ligação dupla, X é ausente e Y é -H, e quando é uma ligação simples, X é -H ou um grupo amina protetor que converte o composto na profármaco;

[000520] Y é selecionado de -H, -OH, um éter representado por -OR, um sulfito -SO₃, ou um bissulfito -OSO₃;

[000521] R é selecionado de alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000522] nn é 0 ou um inteiro de 1 a 5;

[000523] um de R₂, R₃, R₂' e R₃' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente) e os outros são -H, -NRCOR', ou -NO₂;

[000524] um de L', L'' ou L''' é o grupo de ligação com um grupo reativo

ligado a este (se presente), contanto que quando um de L', L'' ou L''' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este, os outros são -H (por exemplo, se L' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este, então L'' e L''' são -H);

[000525] G é -CH- ou -N-, ou seus solvatos, sais, hidratos ou sais hidratados, seus isômeros ópticos, racematos, diastereoisômeros, enantiômeros ou as estruturas cristalinas polimórficas farmaceuticamente aceitáveis destes compostos.

[000526] Em outra modalidade específica, um de R₂, R₃, R₂' e R₃' de fórmula (A4) e (A6) é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente), e é representado por fórmula -W'-R^x-V-R^y-J, e os demais são -H; L'' e L''' de fórmula (A5) e (A7) são -H, e L' é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente), e é representado por fórmula

[000527] -W'-R^x-V-R^y-J

[000528] em que:

[000529] W' é ausente, -CR^cR^e-, -O-, -O-C(=O)-, -S-, -CH₂-S-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(R^e)-C(=O)O-, ou -C(=O)-;

[000530] R^x é ausente ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000531] V é ausente, -(CH₂-CH₂-O)_n-, -O-, -O-C(=O)-, -S-, -O-(C=O)O-, O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -C(=O)-, um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

[000532] R^y é ausente ou uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000533] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono;

[000534] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada

ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^c$,

[000535] n é um inteiro de 1 a 24; e

[000536] J é como descritos acima na quarta modalidade específica.

[000537] Preferencialmente, R^c é $-\text{H}$ ou $-\text{Me}$; R^e é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono ou $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^c$; n é um inteiro de 2 a 8; e as demais das variáveis são como descrito acima na quarta modalidade específica.

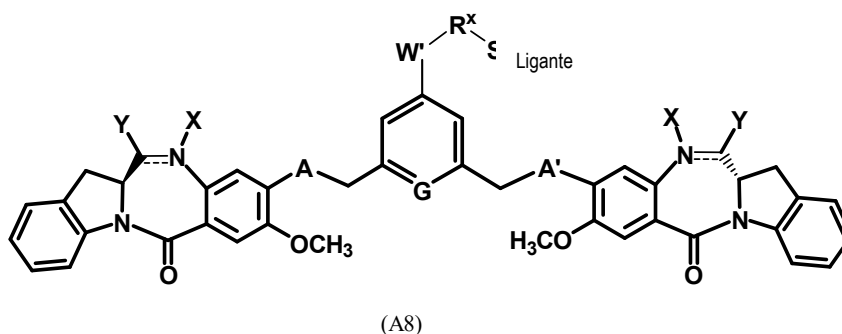
[000538] Em outra modalidade preferencial, V é um aminoácido ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos. Mais preferencialmente, V é valina-citrulina, gly-gly-gly ou ala-leu-ala-leu.

[000539] Preferencialmente, J é $-\text{SH}$, $-\text{SSR}^d$ ou $-\text{COE}$ como descrito acima.

[000540] Em outra modalidade específica, um de R_2 , R_3 , R_2' e R_3' de fórmula (A4) e (A6) é o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este (se presente), e é representado por fórmula $-\text{W}'\text{-R}^x\text{-S-Z}^s$; L'' e L''' de fórmula (A5) e (A7) são $-\text{H}$, e L' é representado por $-\text{W}'\text{-R}^x\text{-S-Z}^s$, em que as variáveis são como descrito na oitava e nona modalidades específicas.

[000541] Em outra modalidade, os compostos de fórmula (A1)-(A7) (com ou sem pré-incubação com o reagente imina-reativo), se o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este não está ainda presente, pode ainda reagir um reagente de reticulação bifuncional descrito acima para formar um fármaco contendo imina contendo o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este, que pode ser usado nos métodos da presente invenção.

[000542] Em determinadas modalidades, o fármaco contendo imina contendo o grupo de ligação com um grupo reativo ligado a este que pode ser usado nos métodos da presente invenção é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000543] "Ligante" é representado por fórmula (a1), (a2), (a3), (a4), (a5), (a6), (a7) ou (a8) descritos acima (na nona modalidade específica);

[000544] q é um inteiro de 1 a 5;

[000545] n é um inteiro de 2 a 6;

[000546] D é -H ou -SO₃M;

[000547] M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável, como Na⁺ ou K⁺; e as demais das variáveis como descrito na oitava ou nona modalidades específicas.

[000548] Preferencialmente, q é 2 e n é 4.

[000549] Em uma modalidade preferencial, Ligante é representado por fórmula (a1), (a4), (a5), (a9) ou (a10) descrito acima.

[000550] Em determinadas modalidades, para os compostos de fórmula (A8) descritos imediatamente acima, as variáveis são como descrito abaixo:

[000551] W' é -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(COR^e)-, -S- ou -CH₂-S-;

[000552] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000553] R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amina primária, secundária ou terciária ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina;

[000554] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como

descrito acima na modalidade imediatamente acima.

[000555] Preferencialmente, R^k é -H ou -Me e n é um inteiro de 2 a 8. Preferencialmente, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000556] Em outra modalidade preferencial, o ligante é representado por qualquer uma da fórmula selecionada de fórmulas (a1), (a4), (a5), (a10) e (a11) mostradas acima; e as demais das variáveis são como descrito acima na nona modalidade específica.

[000557] Em determinadas modalidades, para os compostos de fórmula (A8) descritos nas modalidades acima, as variáveis são como descrito abaixo:

[000558] X' e Y' são ambos -H;

[000559] A e A' são ambos -O-;

[000560] R_6 é -OMe;

[000561] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; e as demais das variáveis são como descrito acima.

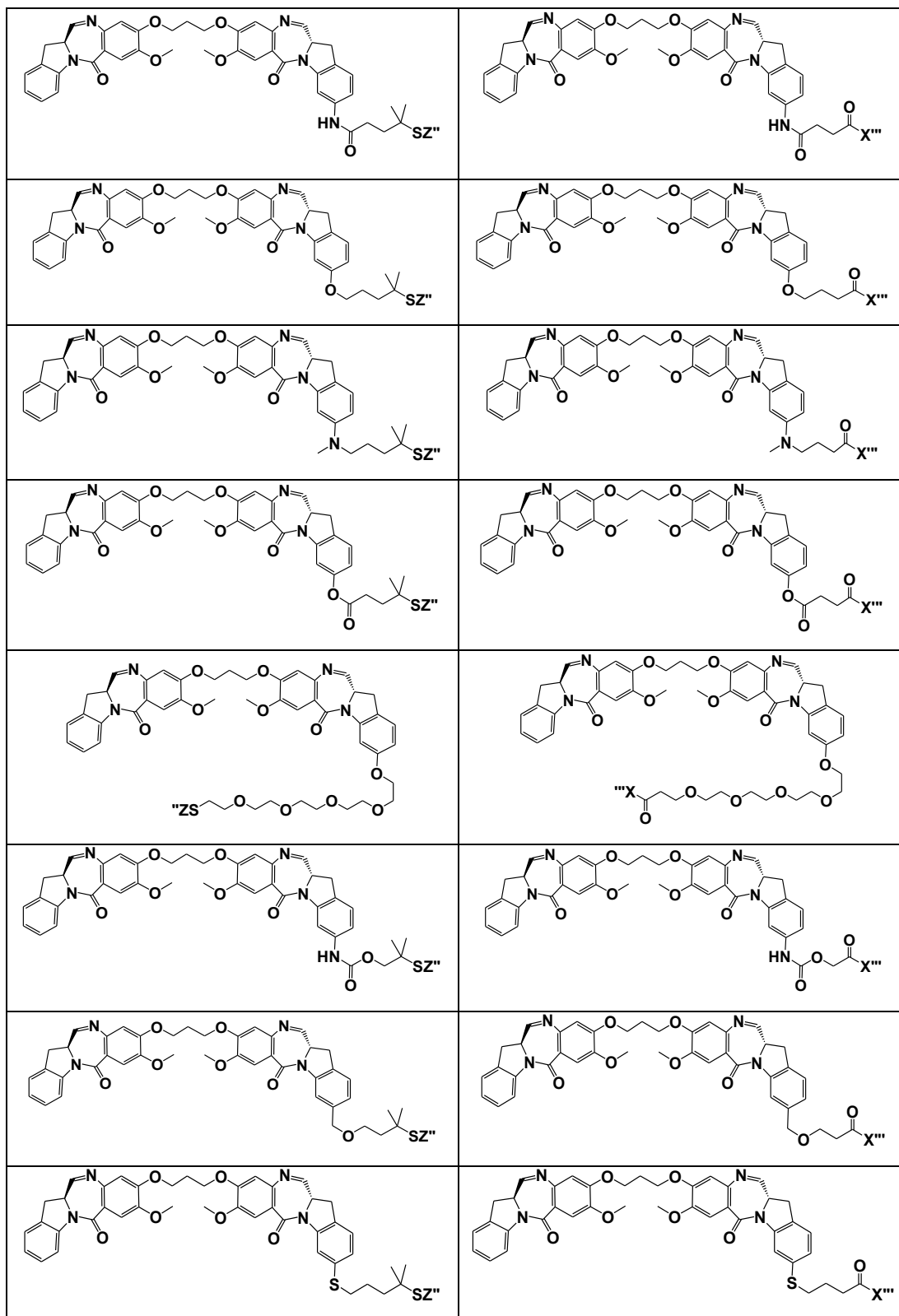
[000562] Preferencialmente, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f and R^g são os mesmos ou diferentes e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000563] Em outra modalidade preferencial, o ligante é representado por qualquer uma das fórmulas selecionadas de fórmulas (a1), (a4), (a5), (a10) e (a11) mostradas acima; e as demais das variáveis são como descrito acima.

[000564] Em outra modalidade preferencial, o fármaco de fórmula (A1), (A2) ou (A3) é qualquer uma dos compostos mostrados nas tabelas 11-13 e o conjugado pode ser feito pelo método da presente invenção é qualquer um dos conjugados mostrados na tabela 14.

Tabela 11. Estruturas de fármacos representativas que podem ser

usadas nos métodos da presente invenção.



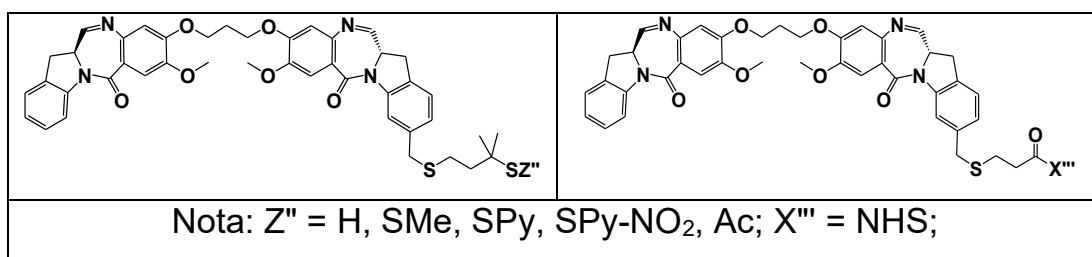
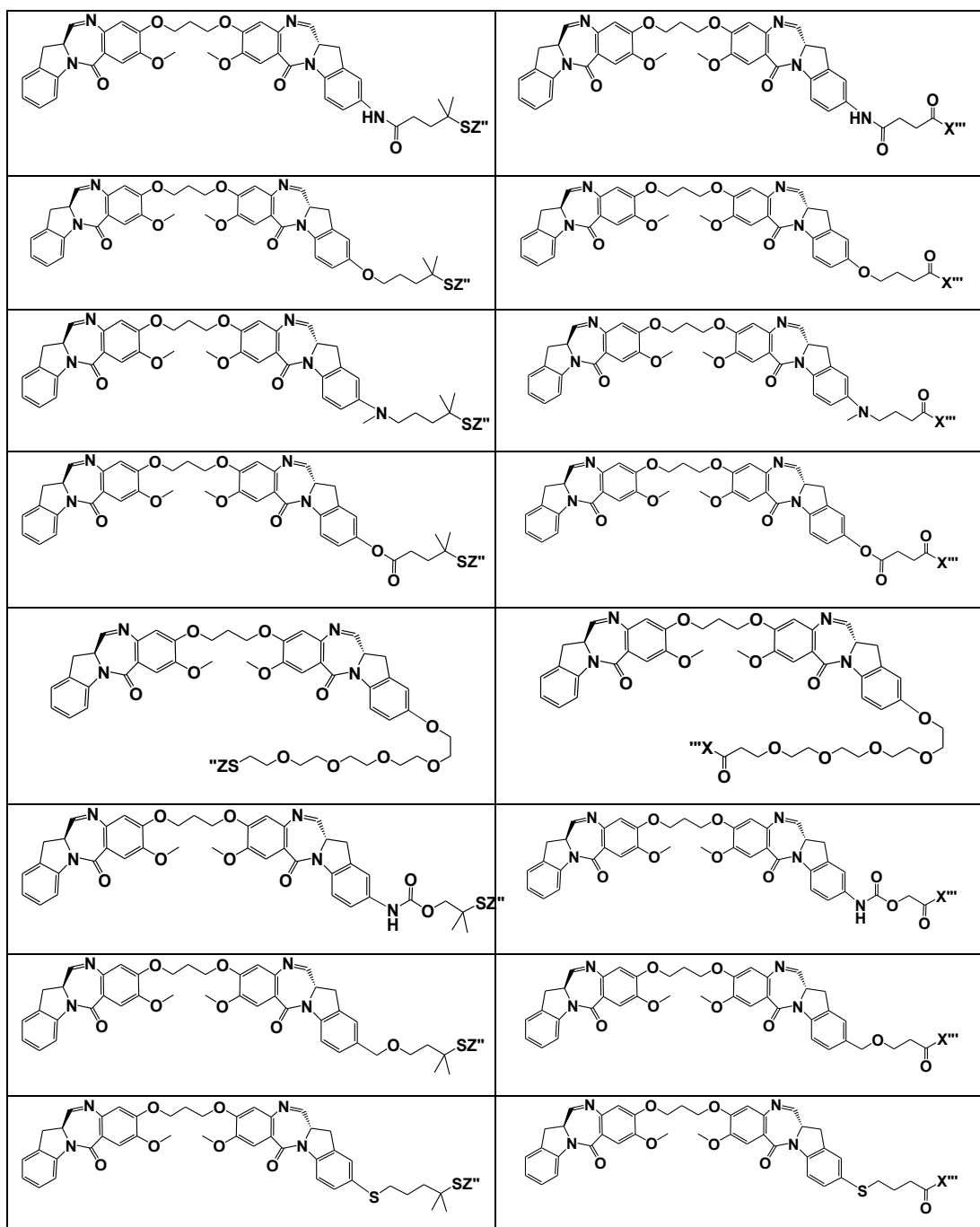


Tabela 12. Estruturas de fármacos representativas que podem ser usadas nos métodos da presente invenção (Continuação).



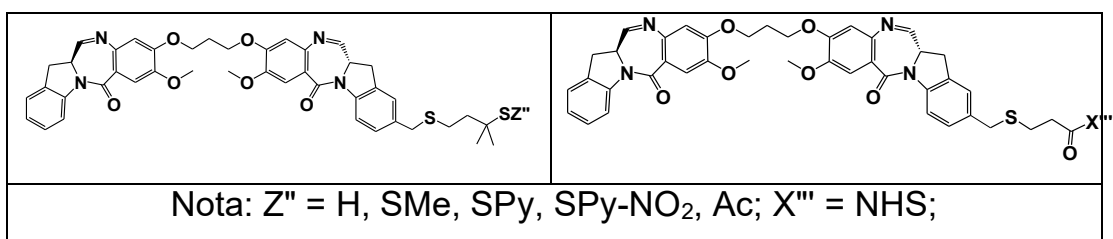
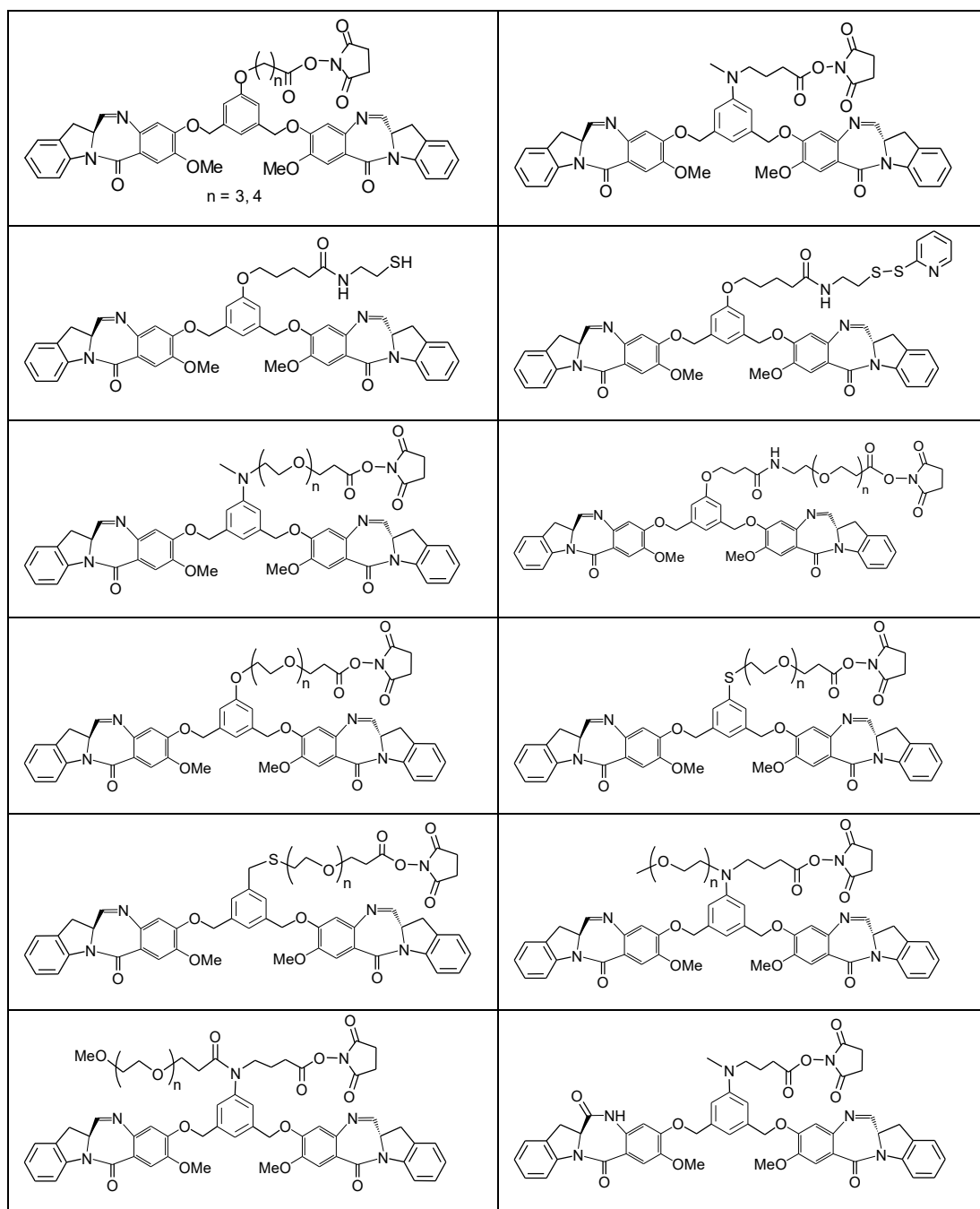


Tabela 13. Estruturas de fármacos representativas que podem ser usadas nos métodos da presente invenção (Continuação).



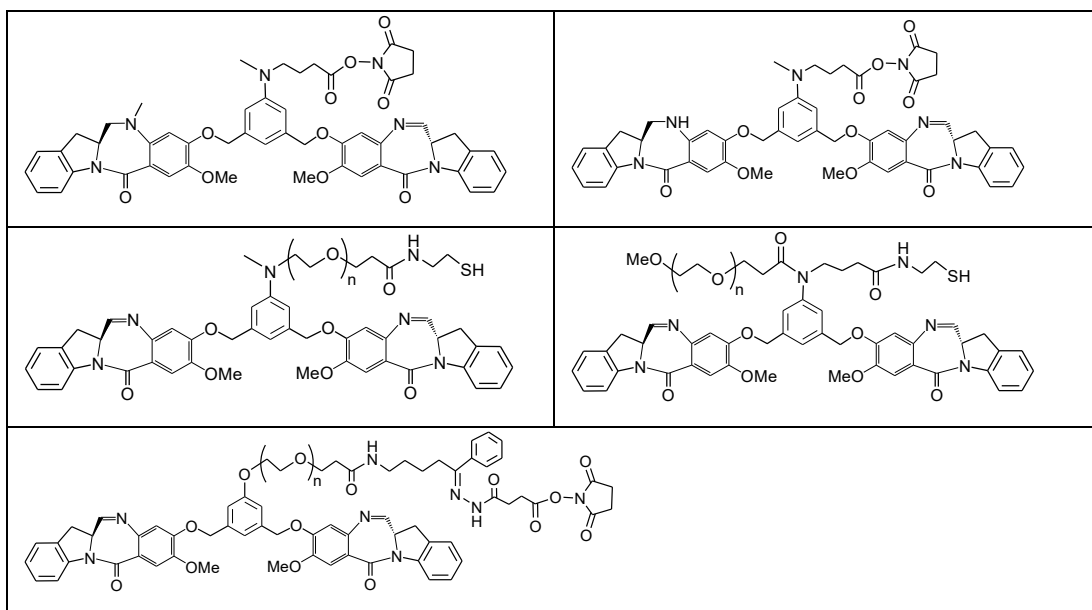
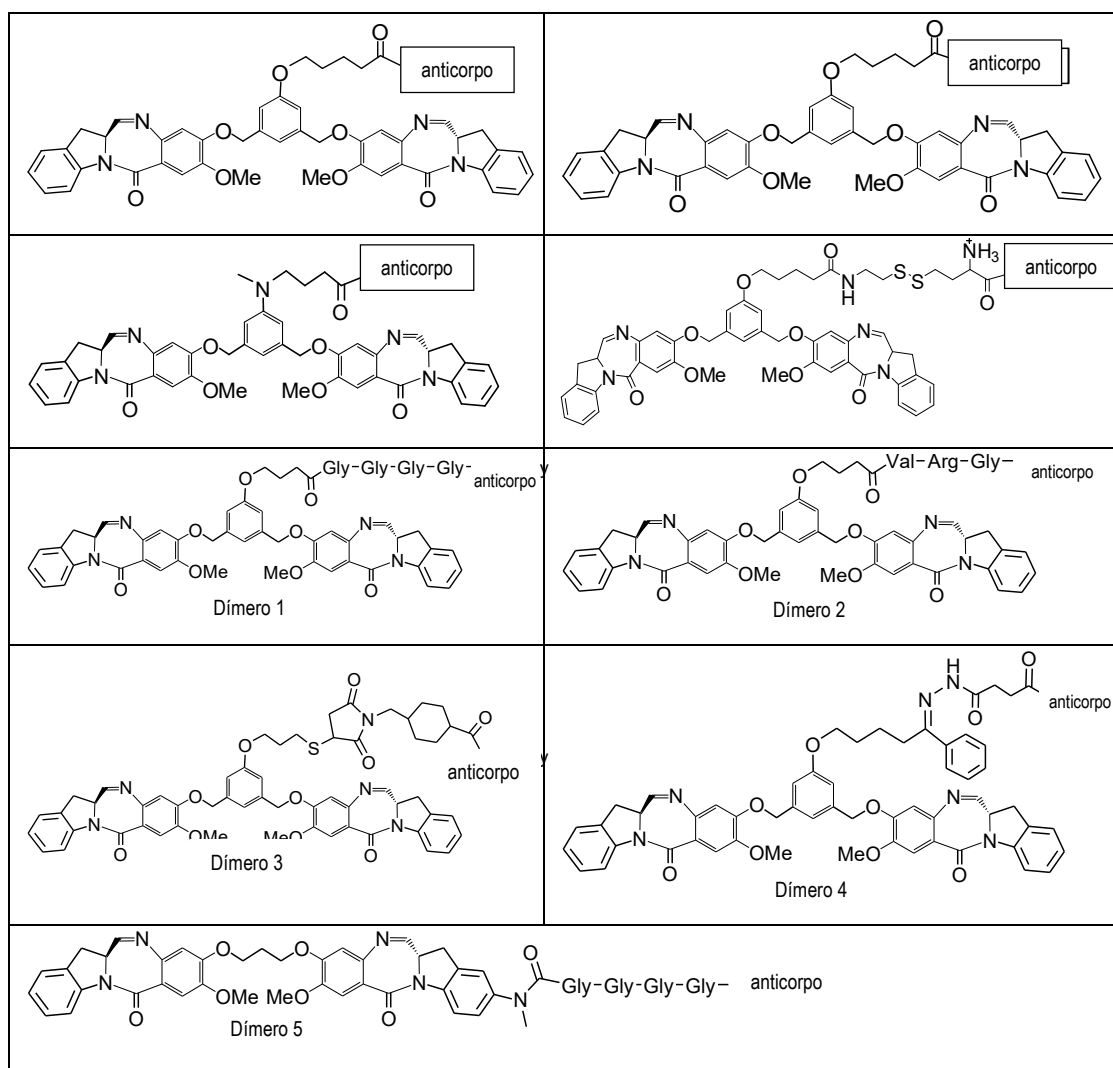
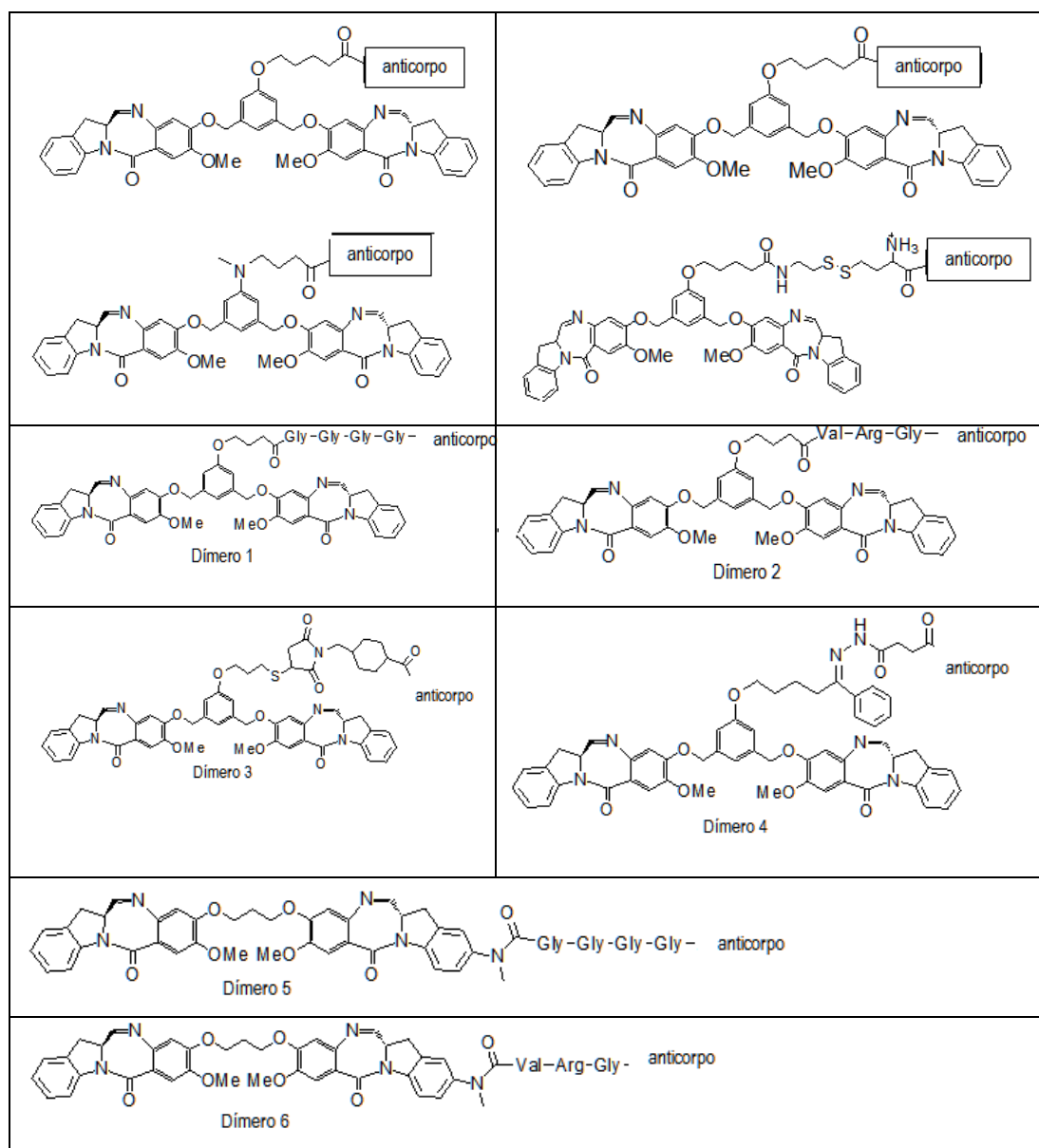
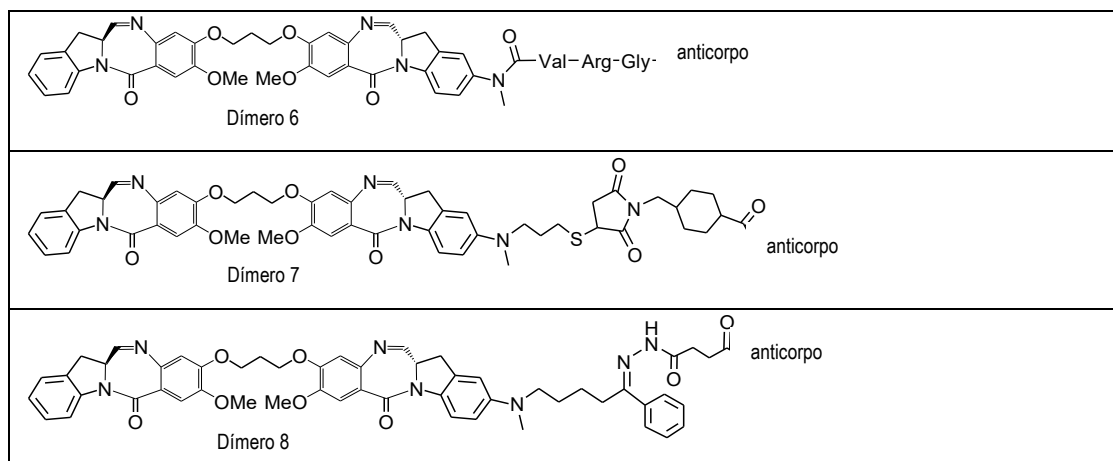
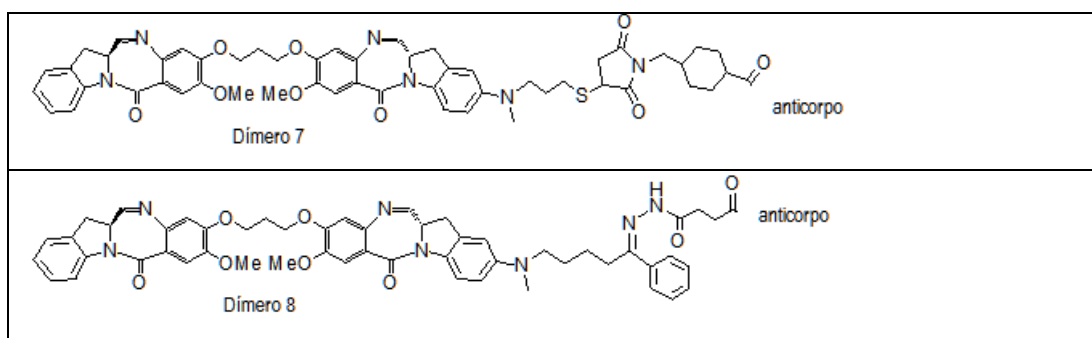


Tabela 14. Estruturas de conjugados representativos que podem ser preparados pelos métodos da presente invenção.







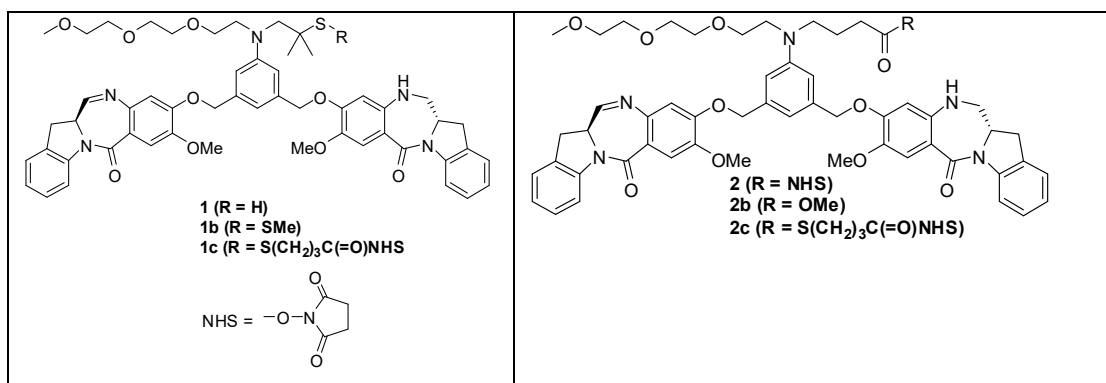
[000565] Qualquer um dos compostos das tabelas 11-13 e qualquer um dos conjugados da tabela 14 podem ter pelo menos uma destas ligações imina reagida com um reagente reativo imina objeto, assim formando um aduto, como aduto bissulfito.

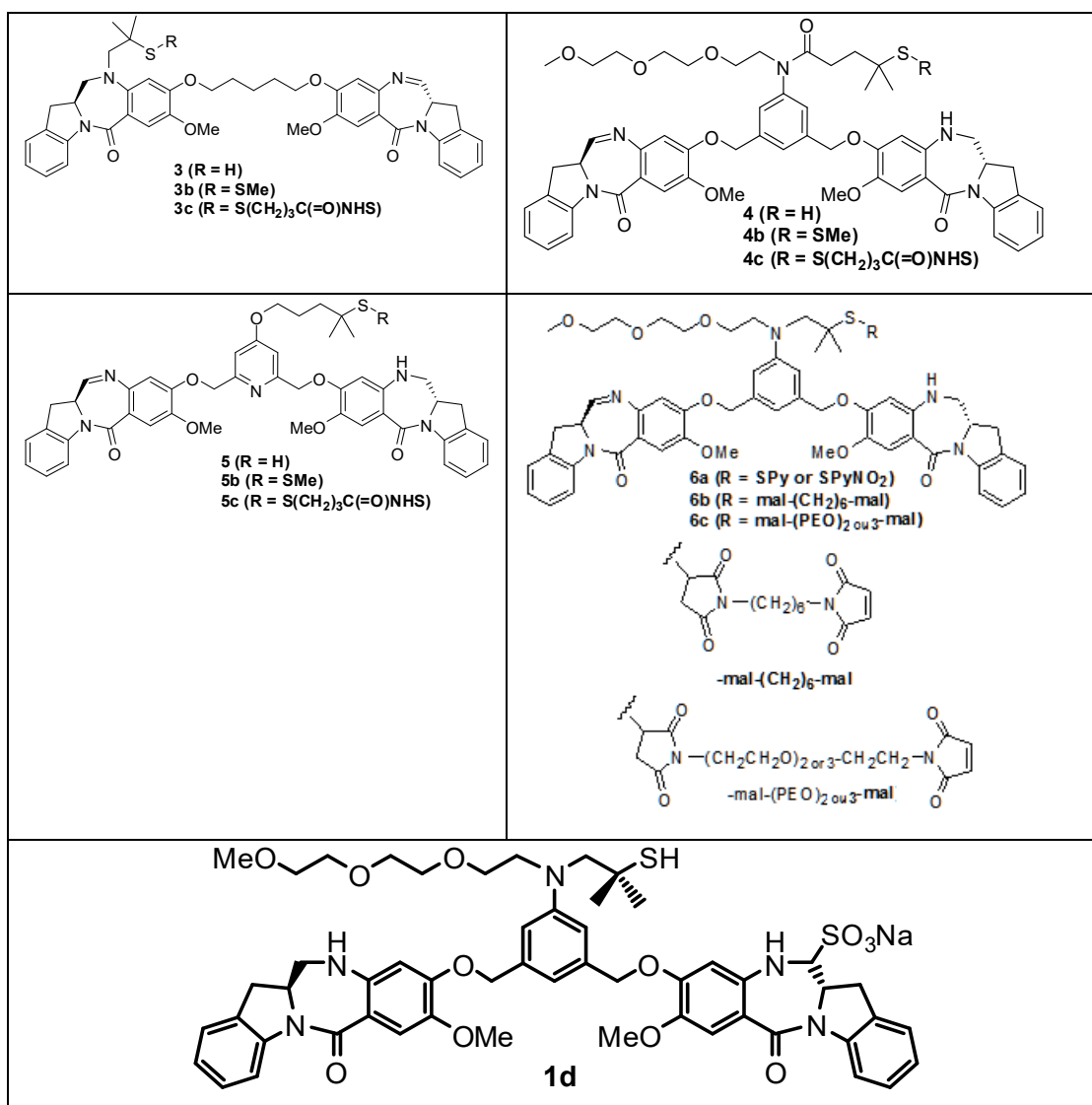
[000566] Em uma modalidade, o fármaco contendo imina contendo uma porção ligante são aquelas contendo um grupo éster reativo, um tiol ou um grupo reativo tiol descrito acima.

[000567] Alternativamente, os fármacos descritas acima podem ainda reagir com agente de reticulação bifuncional para formar um fármaco contendo uma porção ligante. Qualquer agente de reticulação bifuncional descrito pode ser usado.

[000568] Em outra modalidade preferencial, o fármaco que pode ser usada na presente invenção é qualquer uma dos compostos mostrados na tabela 15.

Tabela 15. Compostos de fármaco representativos que podem ser usados nos presentes métodos.





AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA

[000569] A efetividade dos conjugados da invenção como agentes terapêuticos depende da seleção cuidadosa de um agente apropriado de ligação à célula. Agentes de ligação à célula podem ser de qualquer tipo atualmente conhecido, ou que se torne conhecido e inclui peptídeos e não peptídeos. Geralmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais), linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, vitaminas (como folato *etc.*, que podem ser ligar a um receptor de superfície de célula, por exemplo, um receptor de folato), moléculas de transporte de nutriente (como transferrina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação à célula.

[000570] Em determinadas modalidades, os agentes de ligação à célula são proteínas ou polipeptídeos, ou compostos compreendendo proteínas ou polipeptídeos. Preferencialmente, as proteínas ou polipeptídeos compreendem um ou mais resíduos Lys com grupos de cadeia lateral $-NH_2$. Alternativamente ou além disso, as proteínas ou polipeptídeos compreendem um ou mais resíduos Cys. Os grupos de cadeia lateral $-SH$ dos resíduos Cys podem ser intactos, ou podem ser em uma ligação dissulfeto que pode ser reduzida. Preferencialmente, a redução das ligações dissulfeto não significativamente negativamente impacta a função de ligação à célula das proteínas ou polipeptídeos (por exemplo, no caso de anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, redução das ligações dissulfeto não substancialmente aumenta a dissociação de cadeias leves/cadeias pesadas).

[000571] Os grupos $-NH_2$ de cadeia lateral Lys e /ou os grupos $-SH$ de cadeia lateral Cys podem ser covalentemente ligados aos ligantes, que são, por sua vez, ligados aos dímeros compostos da invenção, assim conjugação de agentes de ligação à célula aos dímeros compostos da invenção. Cada agente baseado em proteína de ligação à célula pode conter vários grupos $-NH_2$ de cadeia lateral Lys e/ou os grupos $-SH$ de cadeia lateral Cys disponíveis para ligação dos compostos da invenção através de reticulantes bifuncionais.

[000572] Exemplos de agentes de ligação à célula mais específicos que podem ser usados incluem:

[000573] anticorpos policlonais;

[000574] anticorpos monoclonais;

[000575] fragmentos de anticorpos como Fab, Fab', e $F(ab')_2$, Fv, minibodies, diabodies, tribodies, tetrabodies (Parham, *J. Immunol.* 131:2895-2902 (1983); Spring *et al. J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-244 (1960), Kim *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 7: 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6: 343-

357 (2006));

[000576] interferons (por exemplo, α , β , γ);

[000577] linfocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

[000578] hormônios como insulina, TRH (hormônio de liberação de tirotropina), MSH (hormônio estimulante de melanócito), hormônios esteroides, como androgênios e estrogênios;

[000579] fatores de crescimento e fatores estimulantes de colônias como EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF e GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984));

[000580] transferrina (O'Keefe *et al. J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985));

[000581] vitaminas, como folato;

[000582] Estruturas de proteína baseadas em uma sequência consenso de repetições de fibronectina tipo III (FN3) (também conhecido como Centyrins; ver publicação de patente US 2010/0255056, incorporado aqui por referência);

[000583] Proteínas de repetição de anquirina Designer (DARPin; publicação de patente US 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100, incorporadas aqui por referência), C. Zahnd *et al.* 2010, *Cancer Res.*, 70; 1595-1605, incorporadas aqui por referência); e,

[000584] Proteínas de estrutura de domínio de Fibronectina (Adnectins: Publicação de Patente US 20070082365; 20080139791, incorporadas aqui por referência).

[000585] Técnicas de anticorpos monoclonais permitem a produção de agentes extremamente específicos de ligação à célula na forma de anticorpos monoclonais específicos. Particularmente bem conhecidos na técnica são técnicas para a criação de anticorpos monoclonais produzidos por camundongos, ratos, hamsters ou qualquer outro mamífero imunizante com o antígeno de interesse como a célula-alvo intacta, antígenos isolados da célula-alvo, cujos vírus, vírus inteiros

atenuados, e proteínas virais como proteínas de cobertura viral. Células humanas sensibilizadas podem ainda ser usadas. Qualquer método para criar anticorpos monoclonais é o uso de bibliotecas de fago de scFv (região variável de cadeia única), especificamente scFv humana (*ver por exemplo*, Griffiths *et al.*, Patentes US 5.885.793 e 5.969.108; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587). Além disso, anticorpos regenerados revelados em patente US 5.639.641 pode ainda ser usada, como podem os anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados. A seleção do agente de ligação à célula apropriado é uma questão de escolha que depende da população de célula particular que deve ser objetivada, mas nos anticorpos monoclonais humanos gerais são preferenciais conforme um apropriado está disponível.

[000586] Por exemplo, o anticorpo monoclonal MY9 é um anticorpo IgG₁ murino que se liga especificamente ao antígeno CD33 {J.D. Griffin *et al* 8 Leukemia Res., 521 (1984)} e pode ser usado se as células-alvo expressam CD33 como na doença de leucemia mieloide aguda (AML). O agente de ligação à célula pode ser qualquer composto que se liga a uma célula, em um modo específico ou não específico. Geralmente, estes podem ser anticorpos (especialmente anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpo), interferons, linfocinas, hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (como transferrina), ou qualquer outra molécula ou substância de ligação à célula.

[000587] Onde o agente de ligação à célula é um anticorpo, este se liga a um antígeno que é um polipeptídeo e pode ser uma molécula transmembrana (*por exemplo*, receptor) ou um ligante como um fator de crescimento. Antígenos exemplares incluem moléculas como renina; um hormônio de crescimento, incluindo hormônio de crescimento humano e hormônio de crescimento bovino; fator de liberação de

hormônio de crescimento; hormônio paratireoide; hormônio estimulante de tireoide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; proinsulina; hormônio folículo estimulante; calcitonina; hormônio luteinizante; glucagon; fatores de coagulação como fator vmc, fator IX, fator tecidual (TF), e fator de von Willebrands; fatores anti-coagulantes como proteína C; fator atrial natriurético; surfactante pulmonar; um ativador de plasminogênio, como uroquinase ou ativador de plasminogênio humano tipo urina ou tecido (t-PA); bombesina; trombina; fator de crescimento hemopoietico; fator de necrose tumoral alfa e beta; encefalinase; RANTES (regulado na ativação normalmente expressa e secretada em célula T); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); albumina sérica, como albumina sérica humana; substância inibidora de Muellerian; relaxina cadeia A; relaxina cadeia B; prorelaxina; peptídeo associado a gonadotropina de camundongo; uma proteína microbiana, como beta-lactamase; DNase; IgE; um antígeno associado ao linfócito T citotóxico (CTLA), como CTLA-4; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormônios ou fatores de crescimento; proteína A ou D; fatores reumatoides; um fator neurotrófico como fator neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5, ou 6 (NT-3, NT4, NT-5, ou NT-6), ou um fator de crescimento de nervo como NGF- β ; fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento de fibroblasto como aFGF e bFGF; receptor 2 de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR2); fator de crescimento epidérmico (EGF); fator de crescimento de transformação (TGF) como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, ou TGF- β 5; fator de crescimento-I e -II tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação ao fator de crescimento tipo insulina, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, receptores EphA, receptores EphB, receptor de folato,

FOLR1, mesotelina, cripto, $\alpha_v\beta_6$, integrinas, VEGF, VEGFR, EGFR, receptor de transferrina, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteínas CD como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 ou um anticorpo que se liga a um ou mais antígenos associados ao tumor ou receptores de superfície de célula revelados na publicação US 20080171040 ou publicação US 20080305044 e são incorporados em suas totalidades por referência; eritropoietina; fatores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética de osso (BMP); interferon, como interferon-alfa, -beta, e -gama; fatores estimulantes de colônia (CSFs), *por exemplo*, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF; interleucinas (ILs), *por exemplo*, IL-1 a IL-10; óxido dismutase; receptores de célula T; proteínas de superfície de membrana; fator de aceleração de decaimento; antígeno viral como, *por exemplo*, uma porção do envelope de HIV; proteínas transportadoras; receptores homing; adressinas; proteínas regulatórias; integrinas, como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 e VCAM; um antígeno associado ao tumor como receptor HER2, HER3 ou HER4; endoglina, c-Met, 1GF1R, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4, e fragmentos de qualquer um dos polipeptídeos listados acima.

[000588] Além disso, GM-CSF, que se liga às células mieloides pode ser usado como um agente de ligação à célula às células doentes a partir de leucemia mieloide aguda. IL-2 que se liga às células T ativadas pode ser usado para a prevenção do rejeito de enxerto de transplante, para terapia e prevenção de doença do enxerto-hospedeiro, e para o tratamento de leucemia de célula T aguda. MSH, que se liga aos melanócitos, pode ser usado para o tratamento de melanoma, como os anticorpos podem ser direcionados na direção de melanomas. Ácido

fólico pode ser usado para direcionar o receptor de folato expresso em tumores ovarianos e outros. Fator de crescimento epidérmico pode ser usado para direcionar aos cânceres escamosos como de pulmão e cabeça e pescoço. Somatostatina pode ser usada para direcionar neuroblastomas e outros tipos de tumor.

[000589] Cânceres de mama e testículos podem ser de modo bem sucedido direcionados com estrogênio (ou análogos de estrogênio) ou androgênio (ou análogos de androgênio) respectivamente como agente de ligação à células.

[000590] Em uma modalidade, o agente de ligação à célula é anticorpos monoclonais humanizados. Em outra modalidade, o agente de ligação à célula é huMy9-6, ou outros anticorpos relacionados, que são descritos na patente US 7.342.110 e 7.557.189 (incorporadas aqui por referência). Em outra modalidade, o agente de ligação à célula é um anticorpo de receptor anti-folato descrito no pedido provisório US 61/307.797, 61/346.595, 61/413.172 e pedido US 13/033.723 (publicado como US 2012-0009181 A1). Os ensinamentos de todos estes pedidos são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

[000591] Em determinadas modalidades, o agente de ligação à célula pode ser um anticorpo monoclonal ou porções de ligação ao antígeno do mesmo compartilhando sequências críticas para ligação ao antígeno com um anticorpo revelado aqui, como huMy9-6 ou seus anticorpos relacionados descritos na patente US 7.342.110 e 7.557.189 (incorporadas aqui por referência). Estes anticorpos derivados podem ser substancialmente as mesmas regiões ou idênticas de (1) cadeia leve e/ou cadeia pesada de CDR3; (2) cadeia leve e/ou cadeia pesada de CDR1, CDR2, e CDR3; ou (3) cadeia leve e/ou cadeia pesada, comparado a um anticorpo descrito aqui. As sequências dentro destas regiões podem conter substituições de aminoácido conservadas, incluindo substituintes dentro das regiões CDR. Preferencialmente, não

há mais do que 1, 2, 3, 4, ou 5 substituições conservadas. Em determinadas modalidades, os anticorpos derivados têm uma região de cadeia leve e/ou uma região de cadeia pesada que é pelo menos cerca de 90%, 95%, 99% ou 100% idêntica a um anticorpo descrito aqui. Estes anticorpos derivados podem ter substancialmente a mesma especificidade de ligação e/ou afinidade ao antígeno-alvo comparado a um anticorpo descrito aqui. Preferencialmente, os valores K_d e/ou k_{off} dos anticorpos derivados estão dentro de 10 vezes (maior ou menor), 5 vezes (maior ou menor), 3 vezes (maior ou menor), ou 2 vezes (maior ou menor) de um anticorpo descrito aqui. Estes anticorpos derivados podem ser anticorpos totalmente humanos, ou anticorpos humanizados, ou anticorpos quiméricos. Os anticorpos derivados podem ser produzidos de acordo com os métodos reconhecidos na técnica.

[000592] Em uma modalidade, o anticorpo de receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga a um receptor 1 de folato humano, em que o anticorpo compreende: (a) a cadeia pesada CDR1 compreendendo GYFMN (SEQ ID NO: 1); a cadeia pesada CDR2 compreendendo RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 2); e a cadeia pesada CDR3 compreendendo YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); e (b) a cadeia leve CDR1 compreendendo KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); a cadeia leve CDR2 compreendendo RASNLEA (SEQ ID NO: 5); e a cadeia leve CDR3 compreendendo QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); em que Xaa₁ é selecionado de K, Q, H, e R; Xaa₂ é selecionado de Q, H, N, e R; e Xaa₃ é selecionado de G, E, T, S, A, e V. Preferencialmente, a sequência de cadeia pesada CDR2 compreende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

[000593] Em outra modalidade, o anticorpo de receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano

compreendendo a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLE
WIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDAV
YYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

[000594] Em outra modalidade, o anticorpo anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo codificado pelo plasmídeo de DNA depositado com ATCC em 7 de abril de 2010 e contendo ATCC n.º de depósito PTA-10772 e PTA-10773 ou 10774.

[000595] Em outra modalidade, o anticorpo de receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano compreendendo a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQ
PRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQS
REYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 9); ou

[000596] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYH
QKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA
TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:

10).

[000597] Em outra modalidade o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que especificamente se liga ao receptor 1 de folato humano compreendendo a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8, e a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10. Preferencialmente, o anticorpo compreende a cadeia pesada contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8 e a cadeia leve contendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

[000598] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo codificado pelo plasmídeo de DNA depositado com o ATCC em 7 de abril de 2010 e contendo ATCC n.º de depósito PTA-10772 e PTA-10773 ou 10774.

[000599] Em outra modalidade, o anticorpo receptor anti-folato é um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada pelo menos cerca de 90%, 95%, 99% ou 100% idêntico a

[000600] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVK
QSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLS
LTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11), e
um domínio variável de cadeia leve pelo menos cerca de 90%, 95%,
99% ou 100% idêntico a

[000601] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWYH
QKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAA
TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12);

[000602] ou DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHW
YHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAED
AATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

[000603] Um agente de ligação à célula, como um anticorpo, pode ser modificado com um ligante de reticulação heterobifuncional contendo um grupo amina-reativo, como grupo *N*-hidroxisuccinimida (grupo NHS), um tiol-reativo maleimido, vinilpiridina, vinil sulfona, vinil sulfonamida ou um grupo baseado em haloacetila, ou um grupo tiol.

[000604] Resíduos de tiol no anticorpo podem ser introduzidos por um número de métodos conhecidos na técnica, incluindo: a) modificação de anticorpo com reagentes de geração de tiol como 2-iminotiolano ou homocisteína tiolactona, ou b) através da reação com um agente de reticulação heterobifuncional contendo dissulfeto como SPP, SPDP, SPDB, sulfo-SPDB seguido por redução da ligação dissulfeto com DTT ou TCEP para gerar um tiol livre, c) mutagênese para incorporar resíduos de cisteína não nativos, como anticorpos projetados de cisteína (US2007/0092940 A1, US 2010/0003766 A1, US 7723485 B2), ou d) redução de ligações de dissulfeto nativo (del Rosario, R. B. *et al.*, Cancer Res. Suppl. 1990, 50, 804s-808s).

[000605] Um grupo reativo tiol, como maleimido, vinilpiridina, vinil sulfona, vinil sulfonamida ou um grupo a base de haloacetil no anticorpo pode ser introduzido por modificação de um anticorpo com a agente de reticulação heterobifuncional contendo um grupo reativo tiol (incluindo, entre outros SPDB, *N*-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, sulfo-SMCC, SMCC, LC-SMCC, KMUA, BMPS, GMBS, sulfo-GMBS, EMCS, sulfo-EMCS, AMAS, SVSB, SPP, NHS-(PEG)_n-mal, onde *n* = 1 a 24, preferencialmente 2, 4, 8, 12, e 24). Agentes de reticulação compreendendo uma porção a base de maleimido incluem *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexano-carboxilato (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que é um análogo de "cadeia longa" de SMCC (LC-SMCC), éster *N*-succinimidila de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster *N*-succinimidila de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS),

éster *N*-hidroxisuccinimida de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster *N*-(α -maleimidoacetóxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), e *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPI). Compostos reativos tiol que contêm um vinilpiridina são descritos (Friedman M. et. Al. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1974**, *6*, 183-185; Mak A. et. Al. *Anal. Biochem.* **1978**, *84*, 432-440). Compostos reativos tiol que contêm uma porção de vinil sulfona foram descritos (Masri M. S. J. *Protein Chem.*, **1988**, *7*, 49-54; Morpurgo, M. et. Al. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 363-368) Reagentes de reticulação compreendendo uma porção a base de haloacetil incluem *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), *Iodoacetato de N-succinimidila* (SIA), *Bromoacetato de N-succinimidila* (SBA), e *N*-succinimidil-3-(bromoacetamido)propionato (SBAP).

[000606] O anticorpo modificado pode ser purificado por qualquer método apropriado conhecido na técnica, por exemplo, gel filtração, TFF ou cromatografia de troca iônica ou cromatografia de afinidade.

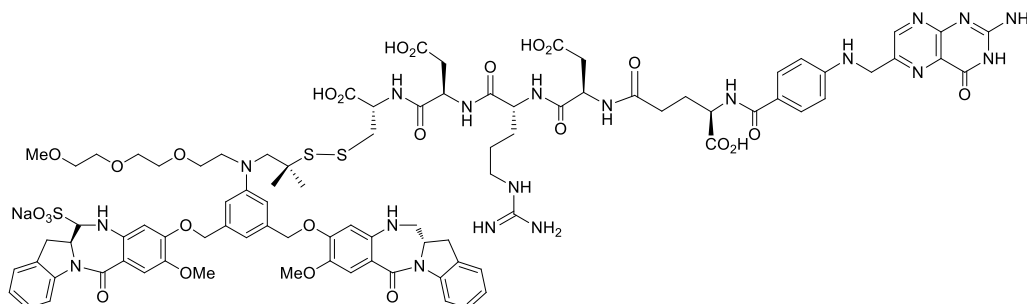
[000607] Todas as referências citadas aqui e nos exemplos que seguem são expressamente incorporados por referência em suas totalidades.

CONJUGADOS DE AGENTE DE LIGAÇÃO À CÉLULA-FÁRMACO

[000608] A presente invenção fornece métodos melhorados para produzir conjugados de agente de ligação à célula-fármaco, compreendendo um agente de ligação à célula ligado a um ou mais compostos citotóxicos da presente invenção através de uma variedade de ligantes, incluindo, entre outros, ligantes dissulfeto, ligantes tioéter, ligantes de ligação a amida, ligantes lábeis a peptidase, ligantes lábeis a ácido, ligantes lábeis a esterase.

[000609] Conjugados representativos que podem ser preparados

usando os métodos da invenção incluem anticorpo/composto citotóxico, fragmento de anticorpo/composto citotóxico, fator de crescimento epidérmico (EGF)/composto citotóxico, hormônio estimulante de melanócito (MSH)/composto citotóxico, hormônio estimulante de tireoide (TSH)/composto citotóxico, somatostatina/composto citotóxico, folato/composto citotóxico, estrogênio/composto citotóxico, análogo de estrogênio/composto citotóxico, androgênio/composto citotóxico, e análogo de androgênio/composto citotóxico. Um conjugado representativo folato/composto citotóxico é descrito abaixo, com o aduto opcional $-\text{SO}_3\text{Na}$ na ligação imina de um dos dois monômeros de fármaco. Um esquema de síntese representativo para este conjugado é mostrado na FIG. 26.



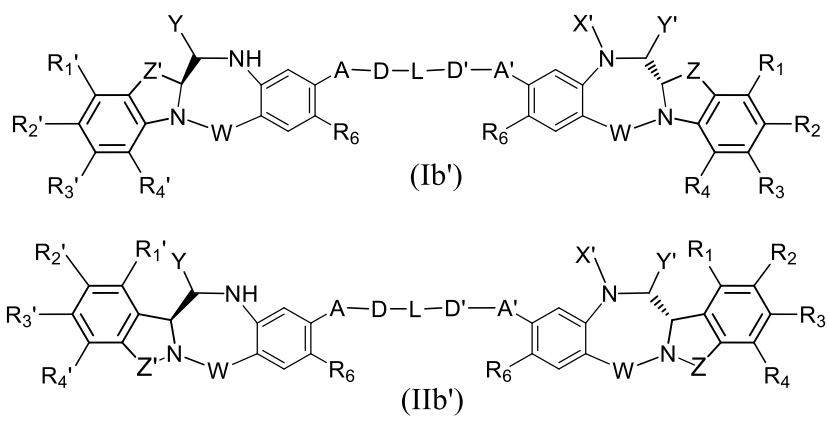
conjugado folato/composto citotóxico

[000610] Em uma modalidade preferencial, a presente invenção fornece métodos para produzir conjugados compreendendo um composto dímero indolinobenzodiazepina (*por exemplo*, fórmulas (Ib'), (IIb'), (Iab'), (IIAb'), (IBb'), (IIBb'), (XIIIb'), (Xb'), *etc.*) e o agente de ligação à célula ligado por uma ligação covalente. O ligante pode ser clivado no local das células de proliferação de tumor/não desejadas para liberar o agente citotóxico ao seu-alvo em um número de vias. O ligante pode ser clivado, por exemplo, por pH baixo (hidrazona), ambiente redutor (dissulfeto), proteólise (ligação de amida/peptídeo), ou por uma reação enzimática (esterase/glicosidase).

[000611] Em um aspecto preferencial, conjugados citotóxicos representativos que podem ser produzidos pelos métodos da invenção

são composto dímero anticorpo/indolinobenzodiazepina, composto dímero de fragmento de anticorpo/indolinobenzodiazepina, composto dímero fator de crescimento epidérmico (EGF)/indolinobenzodiazepina, composto dímero hormônio estimulante de melanócito (MSH)/indolinobenzodiazepina, composto dímero hormônio estimulante de tireoide (TSH)/indolinobenzodiazepina, composto dímero somatostatina/ indolinobenzodiazepina, composto dímero folato/ indolinobenzodiazepina, composto dímero estrogênio/indolinobenzodiazepina, composto dímero análogo de estrogênio/indolinobenzodiazepina, composto dímero antígeno de inibidor membrana específico de próstata (PSMA) /indolinobenzodiazepina, composto dímero inibidor de matriptase /indolinobenzodiazepina, composto dímero proteínas de repetição de anquirina desenhadas (DARPin)s/indolinobenzodiazepina, composto dímero androgênio /indolinobenzodiazepina, e composto dímero análogo de androgênio/ indolinobenzodiazepina.

[000612] Assim na décima quarta modalidade específica, os métodos da invenção produzem um conjugado compreendendo: um composto citotóxico e um agente de ligação à célula (CBA), em que o composto citotóxico é covalentemente ligado ao CBA por um grupo ligante, e em que o composto citotóxico e a porção do grupo de ligação do conjugado é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



ou um sal farmaceuticamente aceitável das mesmas, em que:

[000613] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^{k'}\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-\text{N}(\text{R}^j)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, e $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; $\text{R}^{k'}$ é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente, Y é aduto de um bissulfito, hidrosulfito, ou metabissulfito, ou sais dos mesmos (como sal de sódio);

[000614] X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente

selecionados de O, S, N e P;

[000615] Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos;

[000616] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação;

[000617] R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' e R₄' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -(OCH₂CH₂)_n-R^c, halogênio, guanidínio [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação;

[000618] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável, como Na⁺;

[000619] R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, uma arila opcionalmente substituída contendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico

opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000620] R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

[000621] R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação;

[000622] n é um inteiro de 1 a 24;

[000623] W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

[000624] R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halogênio ou o grupo de ligação;

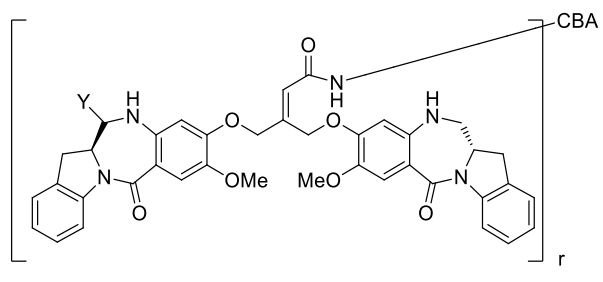
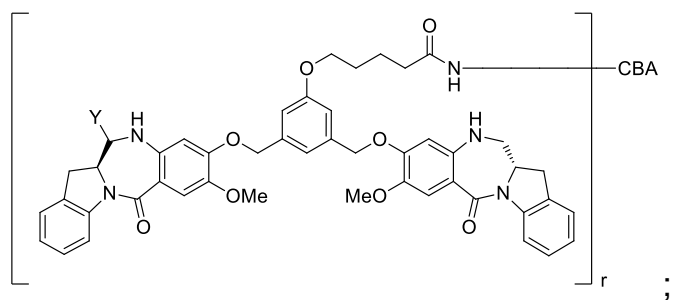
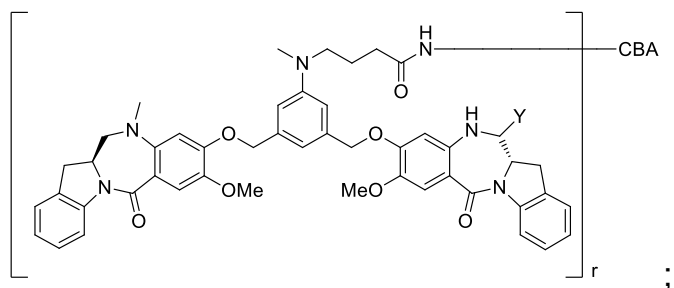
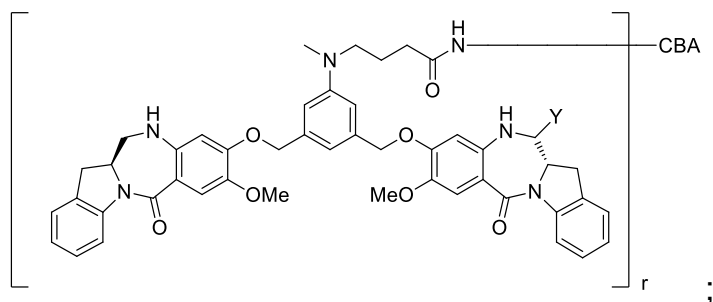
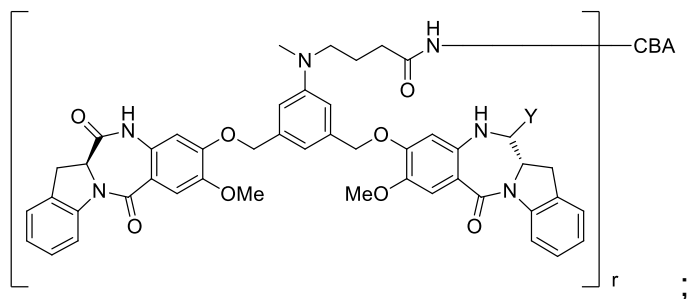
[000625] Z e Z' são independentemente selecionados de -(CH₂)_{n'}-, -(CH₂)_{n'}-CR₇R₈-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-NR₉-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-O-(CH₂)_{na'}- e -(CH₂)_{n'}-S-(CH₂)_{na'}-;

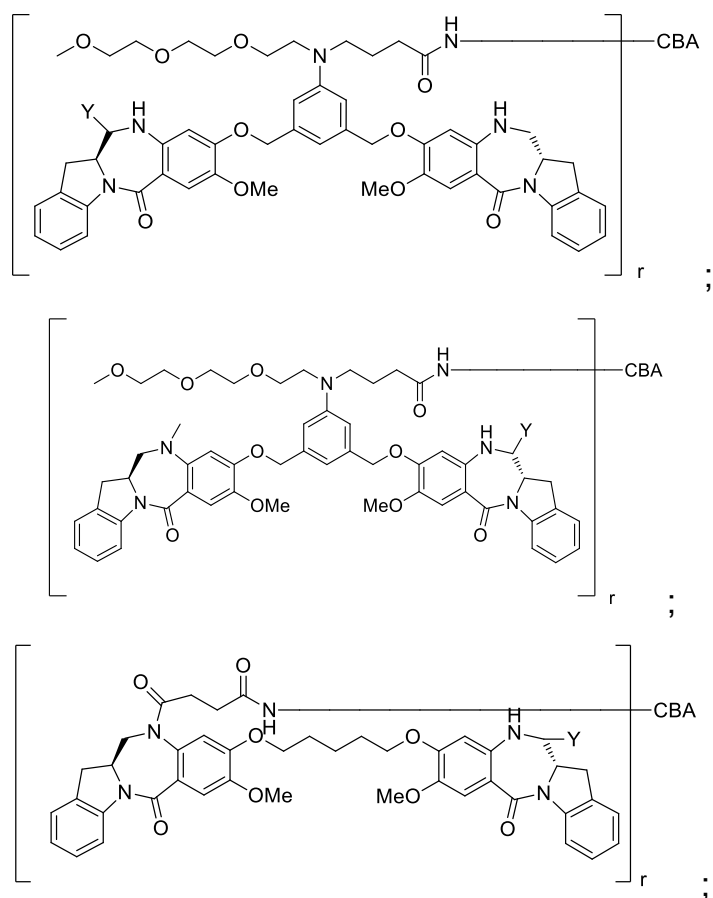
[000626] n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

[000627] R₇ e R₈ são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietilenoglicol -(OCH₂CH₂)_n-, um aminoácido, uma unidade de peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono;

[000628] R₉ é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol -(OCH₂CH₂)_n-;

[000635] Em determinadas modalidades, os conjugados que podem ser sintetizados pelos métodos da invenção incluem o seguinte:



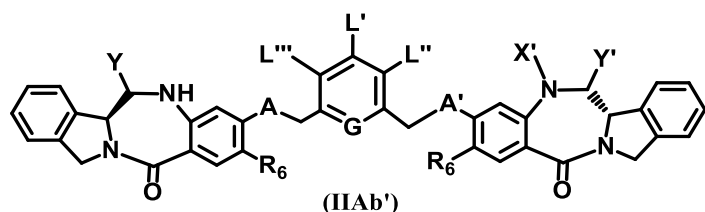
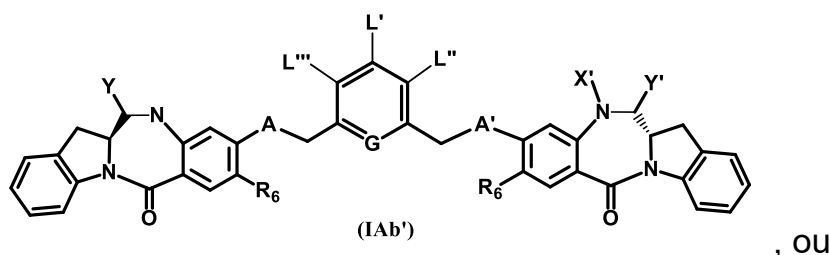


em que:

[000636] CBA é o agente de ligação à célula, r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H, um aduto de um bissulfito, um hidrosulfito, um metabissulfito, ou sais dos mesmos, ou $-\text{SO}_3\text{M}$, e M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável.

[000637] Em determinadas modalidades, L é ausente, ou é selecionado de um grupo fenila opcionalmente substituída e um grupo piridila opcionalmente substituída, em que o grupo fenila e o piridil contêm o grupo de ligação, ou L é um grupo amina contendo o grupo de ligação (*ou seja*, $-\text{N}(\text{grupo ligante})-$), ou L é uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica contendo de 1 a 6 átomos de carbono e contendo o grupo de ligação.

[000638] Na décima quinta modalidade específica, o composto citotóxico ligado ao grupo de ligação é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

[000639] L' , L'' , e L''' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietilenoglicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃M, um sulfato -OSO₃M, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação, contanto que somente um de L' , L'' , e L''' é o grupo de ligação; e

[000640] G é selecionado de -CH- ou -N-. Os demais grupos são como descrito na décima quarta modalidade específica acima.

[000641] Em determinadas modalidades, um de L' , L'' , ou L''' é o grupo de ligação, enquanto os outros são -H. Preferencialmente, L' é o grupo de ligação, e L'' e L''' são -H.

[000642] Em determinadas modalidades, A e A' são ambos -O-, R_6 é -OMe, e G é -CH-.

[000643] Na décima sexta modalidade específica, L' é representado pela seguinte fórmula:

[000644] $-W'-R^x-V-R^y-J$,

[000645] em que:

[000646] W' e V são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou selecionado de $-CR^eR^{e'}$ -, $-O$ -, $-O-C(=O)$ -, $-C(=O)-O$ -, $-S$ -, $-SO$ -, $-SO_2$ -, $-CH_2-S$ -, $-CH_2O$ -, $-CH_2NR^e$ -, $-O-C(=O)O$ -, $-O-(C=O)N(R^e)$ -, $-N(R^e)$ -, $-N(R^e)-C(=O)$ -, $-C(=O)-N(R^e)$ -, $-N(R^e)-C(=O)O$ -, $-N(C(=O)R^e)C(=O)$ -, $-N(C(=O)R^e)$ -, $-(O-CH_2-CH_2)_n$ -, $-SS$ -, ou $-C(=O)$ -, ou um aminoácido, ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos;

[000647] R^x e R^y são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente ausente ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo 1 a 10 átomos de carbono, um aril contendo 6 a 10 átomos de carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros contendo 1 a 3 heteroátomos selecionado de O, N ou S;

[000648] R^e e $R^{e'}$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de $-H$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um $-H$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (*por exemplo*, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono; preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000649] n é um inteiro de 1 a 24; e

[000650] J é covalentemente ligado ao CBA, e é selecionado de uma succinimida, um acetamido, $-S$ -, $-SS$ -, $-CH_2S$ -, $-CH(Me)S$ -, $-C(Me)_2S$ -, $-NR^{c1}$ -, $-CH_2NR^{c1}$ -, $-NR^{c1}N$ -, e $-C(=O)$ -, em que R^{c1} é $-H$ ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída contendo 1 a 4

átomos de carbono.

[000651] Em determinadas modalidades, J é -S-, -SS-, uma succinimida, ou -C(=O)-.

[000652] Em determinadas modalidades, R^{e'} é -H ou -Me; R^e é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k; n é um inteiro de 2 a 8; e R^k é -H, -Me ou -CH₂CH₂-NMe₂, e as demais das variáveis são como descrito acima na décima quinta modalidade específica.

[000653] Em determinadas modalidades, V é um aminoácido ou um peptídeo contendo 2 a 8 aminoácidos.

[000654] Em determinadas modalidades, V é valina-citrulina, gly-gly-gly, ou ala-leu-ala-leu.

[000655] Em determinadas modalidades,

[000656] W' é -O-, -N(R^e)- ou -N(R^e)-C(=O)-;

[000657] R^e é H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k;

[000658] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000659] V é ausente, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

[000660] R^y é ausente ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e

[000661] J é -S-, -SS-, ou -C(=O)-, e os demais grupos são como definido na décima sexta modalidade específica.

[000662] Em determinadas modalidades,

[000663] W' é -O-, -N(R^e)- ou -N(R^e)-C(=O)-;

[000664] R^e é -H, -Me, ou -(CH₂-CH₂-O)_n-Me;

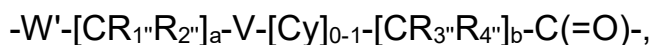
[000665] n é um inteiro de 2 a 6;

[000666] R^x é alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono;

[000667] V e R^y são ausentes; e

[000668] J é -C(=O)-. Os demais grupos são como definido na décima sexta modalidade específica.

[000669] Na décima sétima modalidade específica, L' na décima sexta modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:



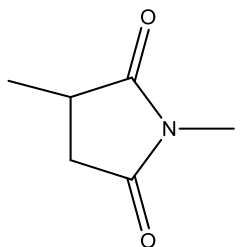
[000670] em que:

[000671] R_1'' , R_2'' , e R_3'' são cada um independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono, preferencialmente -Me;

[000672] R_4'' é -H, uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono (preferencialmente -Me), -SO₃H, ou -SO₃M⁺, em que M⁺ é um cátion farmaceuticamente aceitável;

[000673] a é um inteiro de 0-5 (*por exemplo*, de 0 a 2, 3, 4, ou 5), e b é um inteiro de 0-6 (*por exemplo*, de 0 a 3, 4, 5, ou 6); e,

[000674] Cy é um anel heterocíclico de 5 membros opcionalmente substituído contendo um N heteroátomo, preferencialmente Cy é

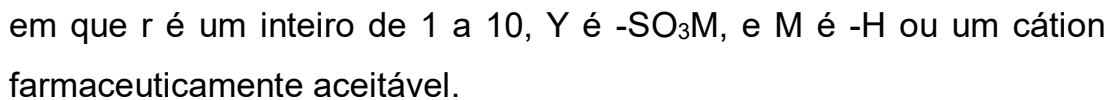
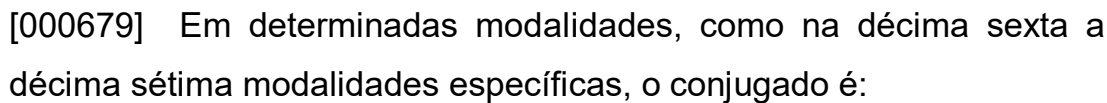


[000675] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, W' é -N(R^e)-.

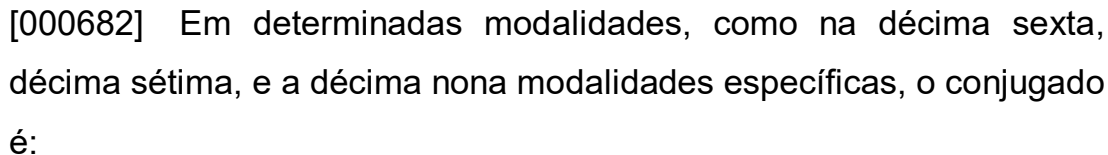
[000676] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, R^e é -(CH₂-CH₂-O)₂₋₆-R^k, em que R^k é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

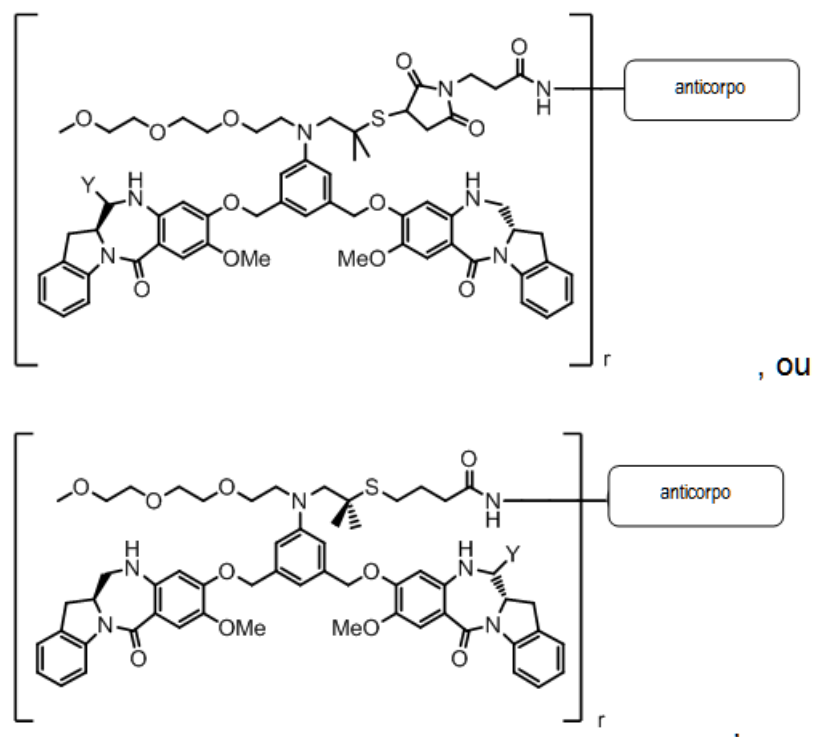
[000677] Em determinadas modalidades, como na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica, V é -S- ou -SS-.

[000678] Na décima oitava modalidade específica, L' na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:



[000681] Na décima nona modalidade específica, L' na décima sexta ou a décima sétima modalidade específica é representado pela seguinte fórmula:

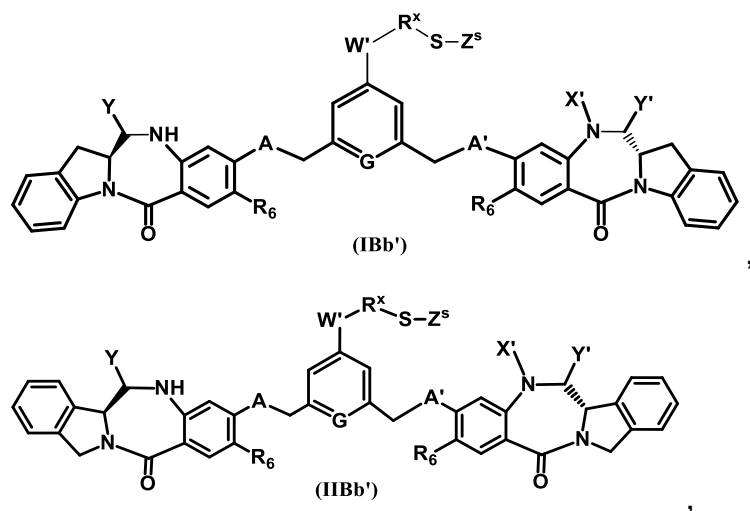




em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é $-\text{SO}_3\text{M}$, e M é $-\text{H}$ ou um cátion farmacologicamente aceitável.

[000683] Em determinadas modalidades, como na décima sexta, décima sétima, e a décima nona modalidades específicas, o anticorpo é huMy9-6.

[000684] Na vigésima modalidade específica, o composto citotóxico ligado ao grupo de ligação é representado pela seguinte fórmula:



em que:

[000685] W' é ausente ou selecionado de $-O-$, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, $-S-$, $-CH_2-S-$, ou $-CH_2NR^e-$;

[000686] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000687] R^e é $-H$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um $-H$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (*por exemplo*, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

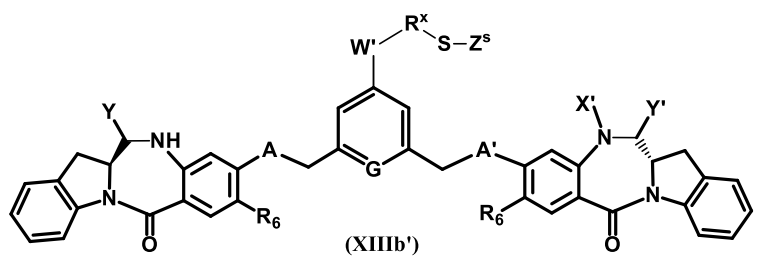
[000688] Z^s é ligado ao CBA, e é uma ligação, ou $-SR^m-$;

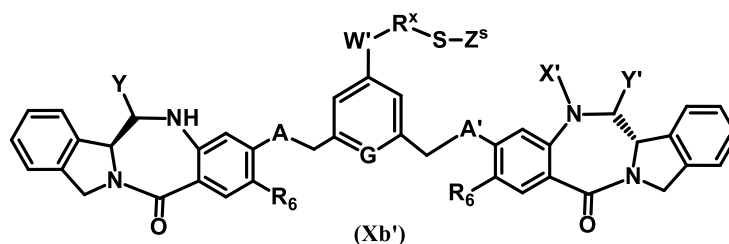
[000689] R^m é R^d ou um alquil substituído linear ou ramificado contendo 1 a 4 átomos de carbono contendo um éster reativo, selecionado de ésteres N-hidroxisuccinimida, ésteres N-hidroxiftalimida, ésteres N-hidróxi sulfo-succinimida, ésteres para-nitrofenila, ésteres dinitrofenila, e ésteres pentafluorfenila;

[000690] R^d é selecionado de fenila, nitrofenila, dinitrofenila, carboxinitrofenila, piridila ou nitropiridila; e

[000691] n é um inteiro de 1 a 24; e as demais das variáveis são como descrito acima na oitava ou a décima quinta modalidade específica.

[000692] Na vigésima primeira modalidade específica, o composto citotóxico ligado ao grupo de ligação é representado pela seguinte fórmula:





em que:

[000693] W' é ausente ou selecionado de $-O-$, $-N(R^e)-$, $-N(R^e)-C(=O)-$, $-N(C(=O)R^e)-$, $-S-$, $-CH_2-S-$, ou $-CH_2NR^e-$;

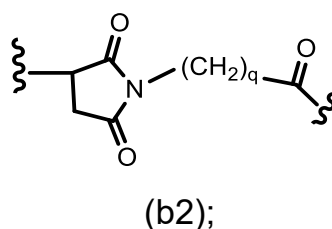
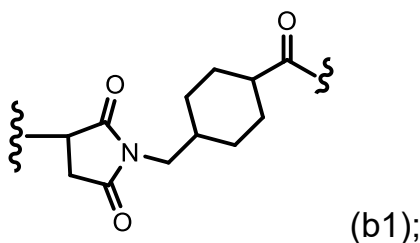
[000694] R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

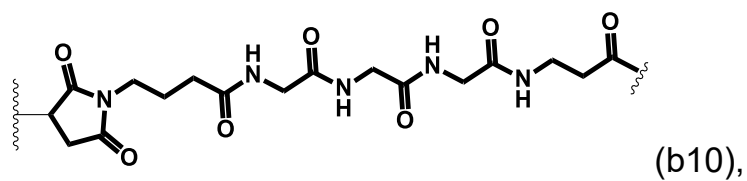
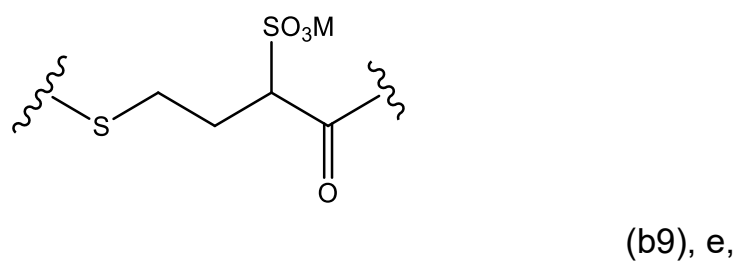
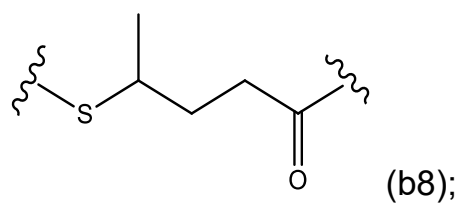
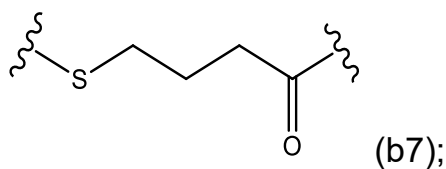
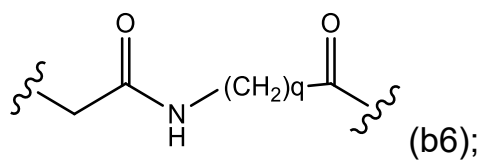
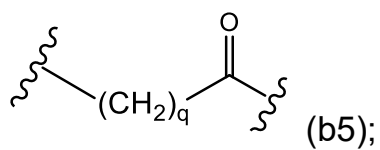
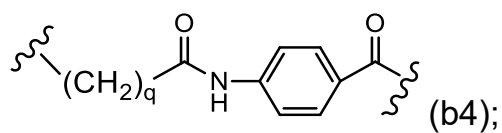
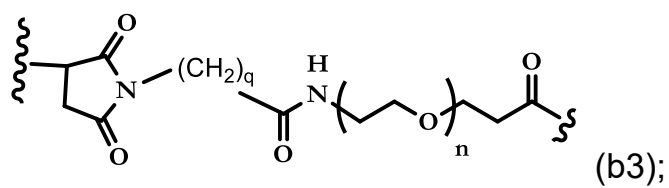
[000695] R^e é $-H$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono ou $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um $-H$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente contendo um grupo amino secundário (*por exemplo*, $-NHR^{101}$) ou amino terciário ($-NR^{101}R^{102}$) ou um heterociclo contendo nitrogênio de 5 ou 6 membros, como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono;

[000696] n é um inteiro de 2 a 6;

[000697] Z^s é ligado ao CBA, e é selecionado de:

[000698] uma ligação;



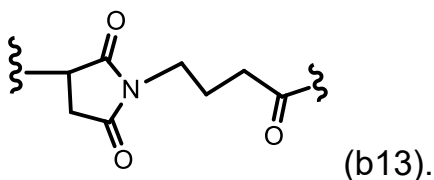
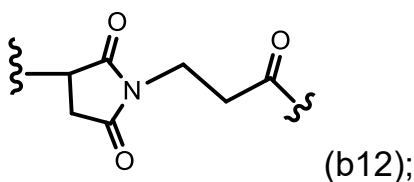
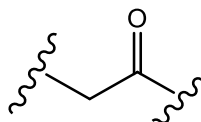
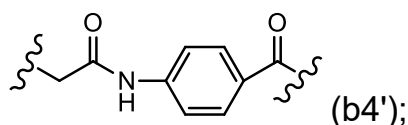
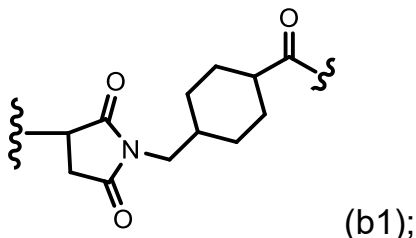


em que:

[000699] q é um inteiro de 1 a 5; e,

[000700] M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável, como Na⁺ ou K⁺.

[000701] Em determinadas modalidades, Z^s é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



[000702] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade específica, W' é $-N(R^e)-$.

[000703] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade específica, R^e é $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, em que R^k é um $-H$, uma alquila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000704] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade específica, R^k é $-H$ ou $-Me$, n é 4, e q é 2.

[000705] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade específica, R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000706] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade

específica, R^x é $-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$, em que R^f and R^g são cada um independentemente selecionados de H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; e p é 0, 1, 2 ou 3.

[000707] Em determinadas modalidades, como a 21ª modalidade específica, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000708] Na vigésima segunda modalidade específica, o conjugado de fórmula (VIIIb') e (Xb') descrito na vigésima primeira modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[000709] Y é $-SO_3M$;

[000710] M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (*por exemplo*, Na^+);

[000711] X' e Y' são ambos -H;

[000712] A e A' são ambos -O-;

[000713] R_6 é -OMe; e

[000714] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000715] Em determinadas modalidades, como a 14ª até a 21ª modalidade específica, Y é selecionado de $-SO_3M$, $-SO_2M$ e um sulfato $-OSO_3M$. Preferencialmente, Y é $-SO_3M$. Preferencialmente, M é -H, Na^+ ou K^+ .

[000716] Em determinadas modalidades, como a 14ª até a 22ª modalidade específica, W, quando presente, é C=O.

[000717] Em determinadas modalidades, como a 14ª até a 22ª modalidade específica, Z e Z', quando presente, são $-CH_2-$.

[000718] Em determinadas modalidades, como a 14ª até a 22ª modalidade específica, X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação, e um grupo de proteção amina. Em

determinadas modalidades, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação. Preferencialmente, X' é -H.

[000719] Em determinadas modalidades, como a 14^a até a 22^a modalidade específica, Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Preferencialmente, Y' é -H ou oxo. Mais preferencialmente, -H.

[000720] Em determinadas modalidades, como a 14^a até a 22^a modalidade específica, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O-, -S-, -N(R₅)-, e oxo (C=O). Preferencialmente, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Mais preferencialmente, A e A' são -O-.

[000721] Em determinadas modalidades, como a 14^a até a 22^a modalidade específica, D e D', quando presentes, são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol (-OCH₂CH₂)_n, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que a alquila, alquenila e alquinila são opcionalmente substituídas por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR'. Preferencialmente, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[000722] Na vigésima terceira modalidade específica, para compostos de fórmula (Ibb') ou (IIBb'), descritos na vigésima modalidade específica, as variáveis são como descrito abaixo:

[000723] Y é -SO₃M;

[000724] M é -H ou Na⁺;

[000725] X' e Y' são ambos -H;

[000726] A e A' são ambos -O-;

[000727] R₆ é -OMe;

[000728] R^x é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono.

[000729] Preferencialmente, R^x é -(CH₂)_p-(CR^fR^g)-, em que R^f e R^g são cada um independentemente selecionados de -H ou uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono; p é 0, 1, 2 ou 3. Mais preferencialmente, R^f e R^g são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H e -Me; e p é 1.

[000730] Na vigésima quarta modalidade específica, o conjugado da presente invenção como descrito na décima quarta, décima quinta, ou a vigésima primeira modalidade específica é representado por o seguinte:

[000731] Y é -SO₃M, em que M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável (*por exemplo*, Na⁺);

[000732] W é C=O;

[000733] R₁, R₂, R₁', R₂', R₄ e R₄' são -H;

[000734] um de R₃, ou R₃' é opcionalmente o grupo de ligação e o outro é -H;

[000735] R₆ é -OMe;

[000736] Z e Z' são -CH₂;

[000737] X' é -H;

[000738] Y' é -H; e

[000739] A e A' são -O-.

[000740] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, Y é selecionado de -SO₃M, -SO₂M e um sulfato -OSO₃M. Preferencialmente, Y é -SO₃M.

[000741] Em determinadas modalidades, como a 14^a até a 24^a modalidade específica, M é -H, Na⁺ ou K⁺.

[000742] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, W, quando presente, é C=O.

[000743] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, Z e Z', quando presente, são -CH₂-.

[000744] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, o grupo de ligação, e um grupo de proteção amina. Em determinadas modalidades, X' é -H, -OH, -Me ou o grupo de ligação. Em determinadas modalidades, X' é -H.

[000745] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída contendo de 1 a 10 átomos de carbono. Em determinadas modalidades, Y' é -H ou oxo. Em determinadas modalidades, Y' é -H.

[000746] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O-, -S-, -N(R₅)-, e oxo (C=O). Em determinadas modalidades, A e A' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -O- e -S-. Em determinadas modalidades, A e A' são -O-.

[000747] Em qualquer uma das modalidades específicas para o conjugado da invenção acima, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, D e D', quando presentes, são os mesmos ou diferentes, e

são independentemente selecionados de uma unidade de polietilenoglicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$, em que n é um inteiro de 1 a 24, um aminoácido, um peptídeo contendo 2 a 6 aminoácidos, ou uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, em que a alquila, alquenila e alquinila são opcionalmente substituídas por um ou mais substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em halogênio, $-\text{OR}$, $-\text{NR}'\text{COR}''$, $-\text{SR}$ e $-\text{COR}'$. Em determinadas modalidades, D e D' são alquila linear ou ramificada contendo 1 a 4 átomos de carbono.

[000748] Em determinadas modalidades, o conjugado de qualquer uma das modalidades descritas, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, pode compreender 1-10 compostos citotóxicos, 2-9 compostos citotóxicos, 3-8 compostos citotóxicos, 4-7 compostos citotóxicos, ou 5-6 compostos citotóxicos, cada composto citotóxico compreendendo o grupo de ligação que liga o composto citotóxico ao CBA, e cada composto citotóxico no conjugado é o mesmo.

[000749] Em determinadas modalidades, o conjugado de qualquer uma das modalidades descritas, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, pode compreender 1-10 compostos citotóxicos, 2-9 compostos citotóxicos, 3-8 compostos citotóxicos, 4-7 compostos citotóxicos, ou 5-6 compostos citotóxicos, cada composto citotóxico compreendendo o grupo de ligação que liga o composto citotóxico ao CBA, e cada composto citotóxico no conjugado é o mesmo.

[000750] Em determinadas modalidades, o conjugado de qualquer uma das modalidades descritas, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, pode compreender 1-10 compostos citotóxicos totais e (não modificado) compostos citotóxicos contendo imina, 2-9 compostos citotóxicos totais e (não modificado) compostos citotóxicos contendo imina, 3-8 compostos citotóxicos totais e (não modificado) compostos citotóxicos contendo imina, 4-7 compostos citotóxicos totais e (não

modificado) compostos citotóxicos contendo imina, ou 5-6 compostos citotóxicos totais e (não modificado) compostos citotóxicos contendo imina, cada um dos compostos citotóxicos ou (não modificado) composto citotóxico contendo imina compreendendo o grupo de ligação aos compostos citotóxicos ou (não modificado) composto citotóxico contendo imina ao CBA, e cada um dos compostos citotóxicos ou (não modificado) composto citotóxico contendo imina no conjugado é o mesmo (exceto para a modificação (bissulfito)).

[000751] Em qualquer uma das modalidades dos conjugados, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, o agente de ligação à célula pode ligar às células-alvo selecionadas de células de tumor, células infectadas por vírus, células infectadas por micro-organismos, células infectadas por parasitas, células autoimunes, células ativadas, células mieloides, células T ativadas, Células B, ou melanócitos; células que expressam os antígenos CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA, ou Her-2; antígenos Her-3; ou células que expressam receptor de fator de crescimento de insulina, receptor de fator de crescimento epidérmico, e receptor de folato.

[000752] Em qualquer uma das modalidades de conjugados, como a 14^a até a 24^a modalidades específicas, o agente de ligação à célula pode ser um anticorpo, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal que especificamente se liga a uma célula-alvo, um anticorpo quimérico, um fragmento de anticorpo quimérico que especificamente se liga à célula-alvo, um domínio de anticorpo, um fragmento de domínio de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, uma linfocina, um hormônio, uma vitamina, um fator de crescimento, um fator estimulante de colônia, ou uma molécula de

transporte de nutriente.

[000753] O anticorpo pode ser um anticorpo de regeneração, um anticorpo de cadeia simples de regeneração, ou um fragmento de anticorpo de regeneração.

[000754] O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal do mesmo.

[000755] O anticorpo pode ser um anticorpo humanizado, um anticorpo humanizado de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo humanizado.

[000756] Em qualquer uma das modalidades específicas aqui, como a 1ª - 24ª modalidades específicas, o reagente reativo imina é selecionado do grupo que consiste em sulfitos (H_2SO_3 , H_2SO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono, di, tri, e tetra- tiofosfatos (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), ésteres de tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), várias aminas (hidroxil amina (por exemplo, NH_2OH), hidrazina (por exemplo, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^{ii}\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$, tiosulfato ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ ou um sal formado com um cátion), hidrazida ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), nucleotídeo glicado (como GDP-mannose), fludarabina ou uma mistura dos mesmos, em que R^i and R^{ii} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e são substituídos por pelo menos um

substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i and R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila.

[000757] Preferencialmente, o reagente reativo imina é selecionado de sulfitos, hidroxilamina, hidrazina e ureia. Mais preferencialmente, o reagente reativo imina é $NaHSO_3$ ou $KHSO_3$.

[000758] Em qualquer uma das modalidades específicas aqui, como a 1ª - 24ª modalidades específicas, cerca de 0,1 a cerca de 30 equivalentes molares do reagente reativo imina ao composto citotóxico contendo imina é usado. Em determinadas modalidades, cerca de 1 a cerca de 10 equivalentes molares do reagente reativo imina ao composto citotóxico contendo imina é usado. Em determinadas modalidades, cerca de 3 a cerca de 5 equivalentes molares do reagente reativo imina ao composto citotóxico contendo imina é usado.

[000759] Em qualquer uma das modalidades específicas aqui, como a 1ª - 24ª modalidades específicas, o agente de ligação cruzada bifuncional liga o agente citotóxico ao agente de ligação à célula por uma ligação tioéter, e pode ter uma porção baseada em maleimido ou haloacetila, em que o agente de ligação cruzada bifuncional contendo a porção baseada em maleimido é selecionado de: N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster N-succinimida de ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimida de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster N-hidroxisuccinimida de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), N-(α -maleimidoacetóxi)-succinimida éster (AMAS), succinimidil-6-(β -

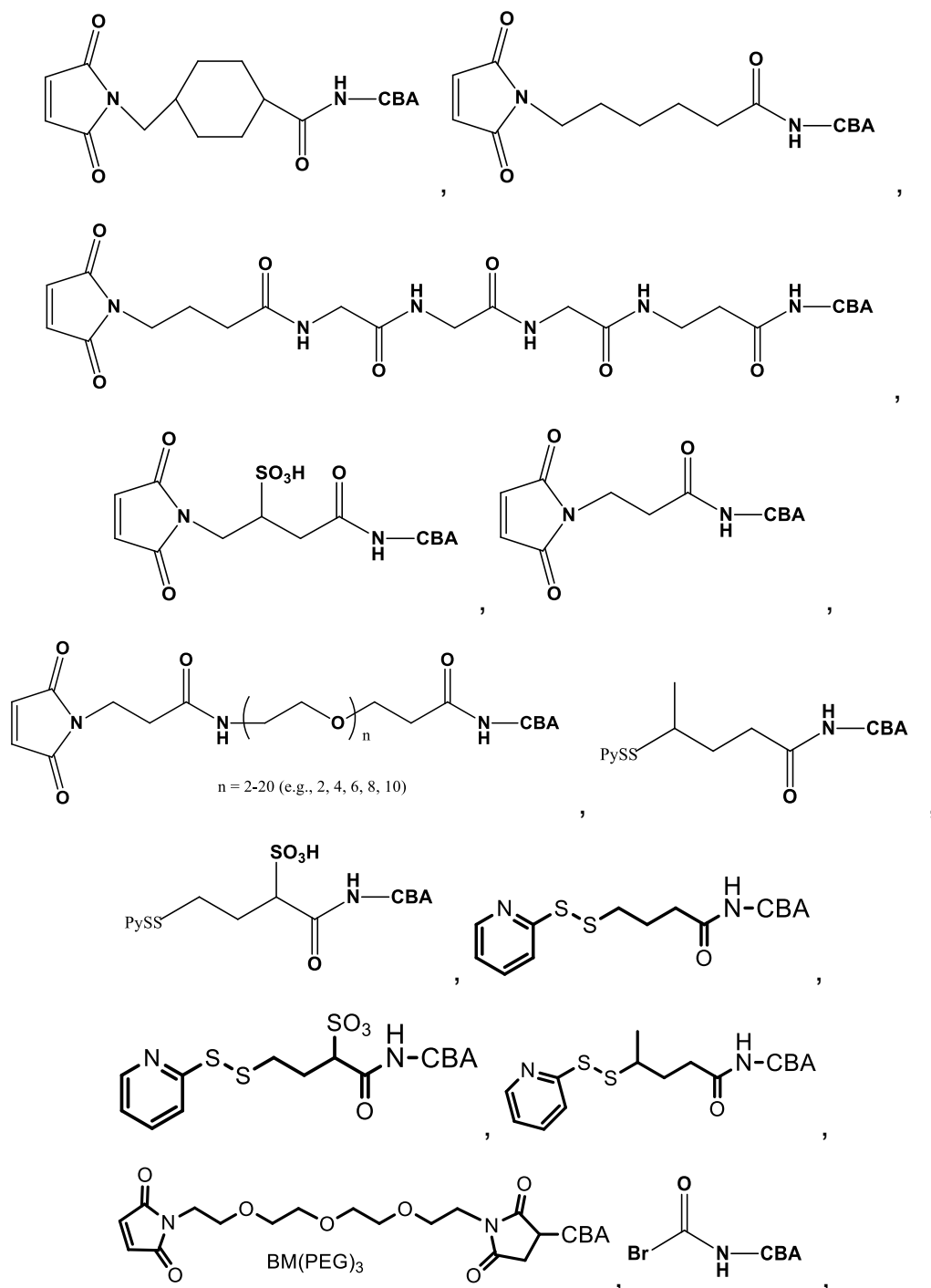
maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato; e, em que o agente de ligação cruzada bifuncional contendo a porção baseada em haloacetila é selecionada de: N-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), Iodoacetato de N-succinimidila (SIA), Bromoacetato de N-succinimidila (SBA), e N-succinimidil-3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(β-maleimidopropilóxi)succinimida éster (BMPS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico hidrazida•HCl (MPBH), Succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-iodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo-MBS), N-(γ-maleimidobutirilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-GMBS), N-(ε-maleimidocaproilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-EMCS), N-(κ-maleimidoundecanoilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-KMUS), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB), CX1-1, sulfo-Mal e PEG_n-Mal.

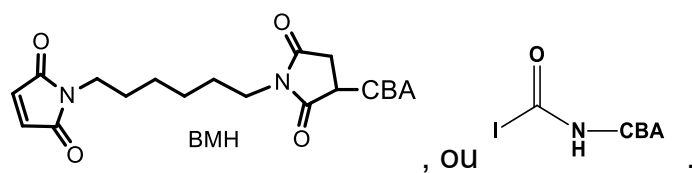
[000760] Em determinadas modalidades, o agente de ligação cruzada bifuncional é selecionado do grupo que consiste em SMCC, Sulfo-SMCC, BMPS, GMBS, SIA, SIAB, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, bis-maleimidohexano ou BMPEO.

[000761] Em qualquer uma das modalidades, como a 1^a - 24^a modalidades específicas, o conjugado é purificado por filtração em fluxo tangencial, cromatografia adsortiva, filtração adsortiva, precipitação seletiva, filtração não adsortiva ou combinação dos mesmos.

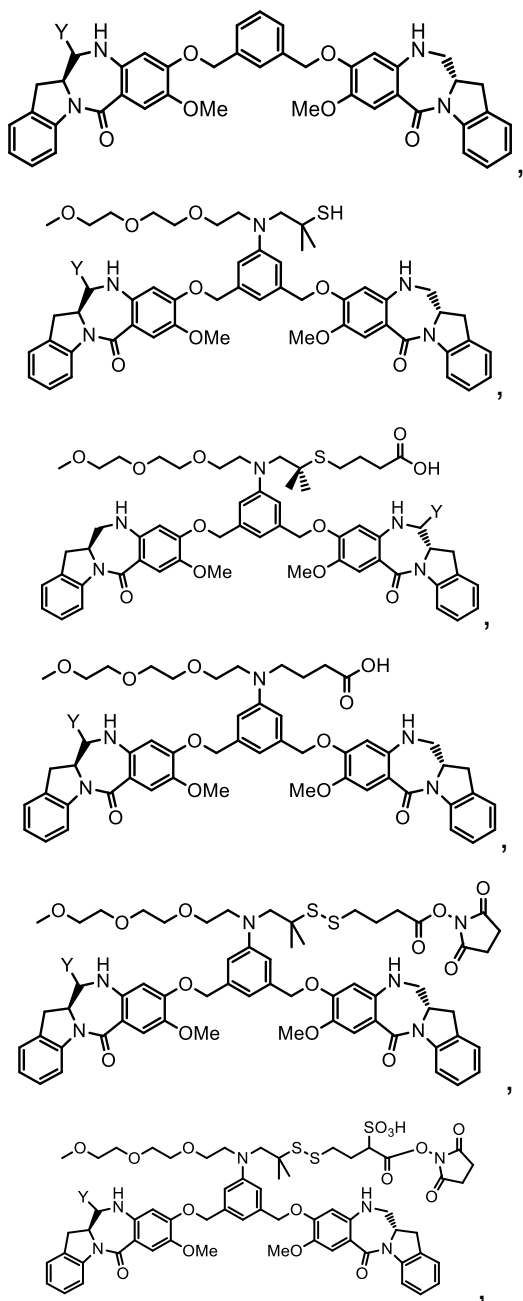
Preferencialmente, o conjugado é purificado por filtração em fluxo tangencial e/ou cromatografia adsortiva.

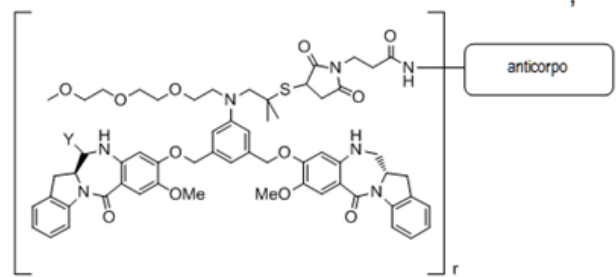
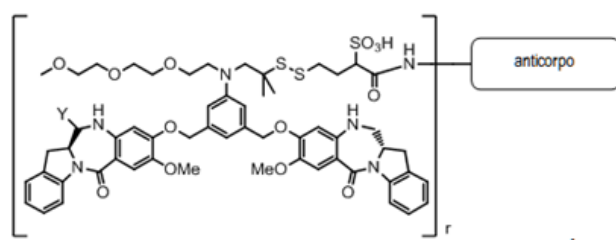
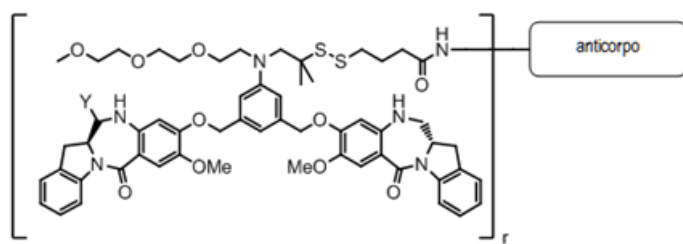
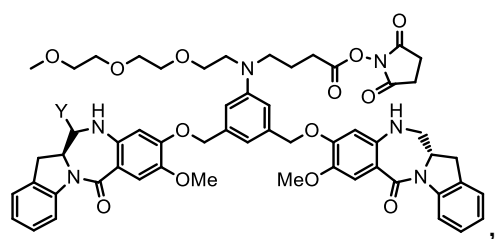
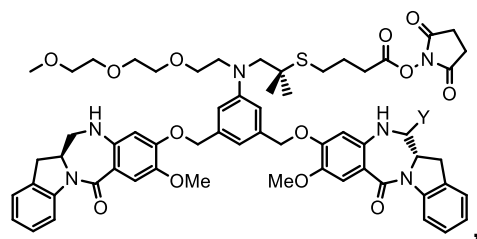
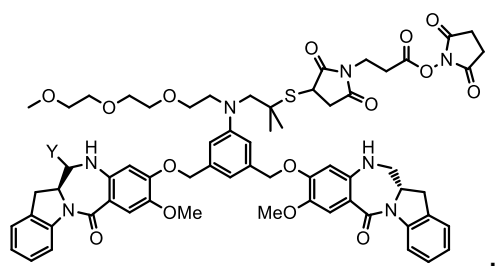
[000762] Em determinadas modalidades, como a 1ª - 24ª modalidades específicas, o agente de ligação à célula (CBA) contendo o grupo reativo tiol é:

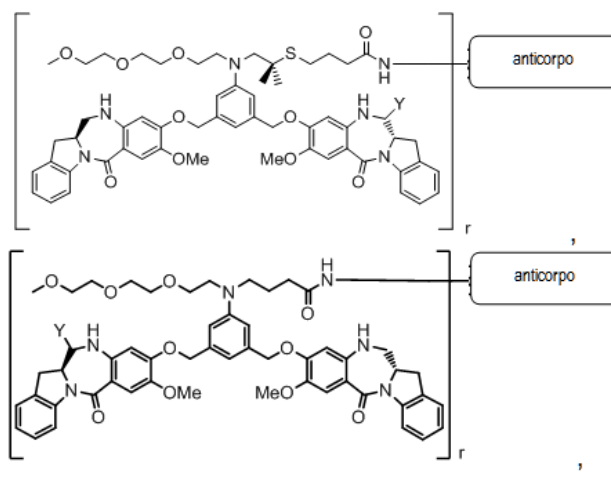




[000763] Os compostos ou os conjugados preparados pelos métodos da invenção especificamente incluem:

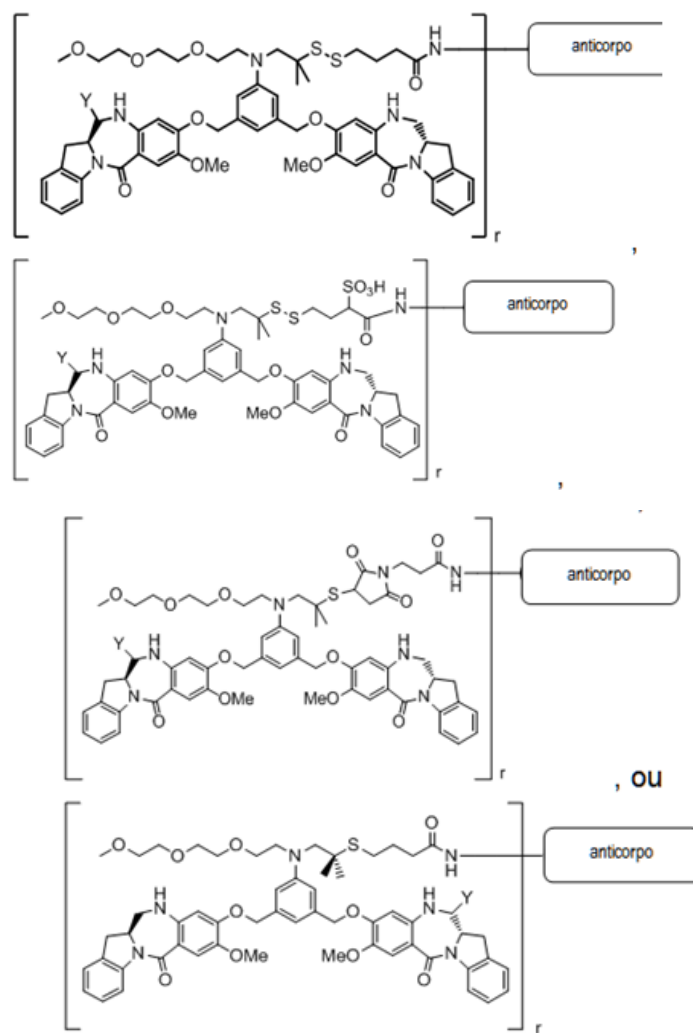




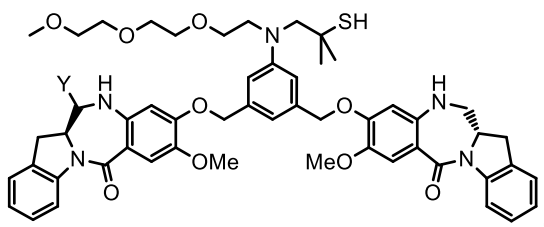


em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é -H ou -SO₃M, e M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável.

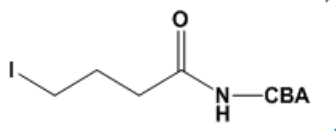
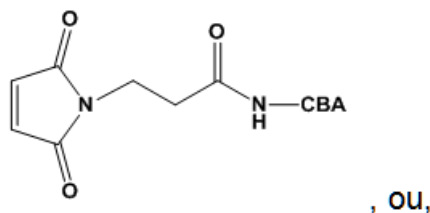
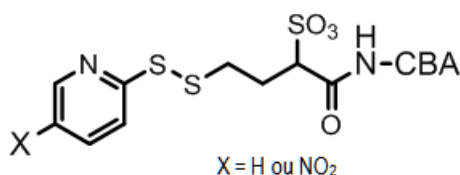
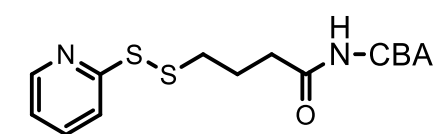
[000764] Na 25ª modalidade específica, a invenção fornece um método para preparar um conjugado da seguinte fórmula:



o método compreendendo reagir um composto citotóxico da seguinte fórmula,



com um CBA modificado da seguinte fórmula, respectivamente, em um pH de cerca de 4 a cerca de 9,



em que:

[000765] r é um inteiro de 1 a 10;

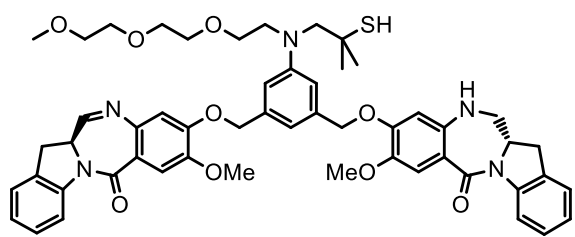
[000766] Y é um grupo de saída, e é um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono-, di-, tri-, e tetra- tiofosfato (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$, POS_3H_2 , PS_4H_2 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), éster tiofosfato ($\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, $\text{R}^i\text{S}-$, R^iSO , R^iSO_2 , R^iSO_3 , tiosulfato (HS_2O_3 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito (HS_2O_4 ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^{k'}) (\text{S})(\text{OH})$ ou um sal

do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($R^kC(=O)NOH$ ou um sal formado com um cátion), formaldeído sulfoxilato ($HOCH_2SO_2^-$ ou um sal de $HOCH_2SO_2^-$ formado com um cátion, como $HOCH_2SO_2^- Na^+$) ou uma mistura dos mesmos, em que R^i é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e é substituído por pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila; preferencialmente Y é $-SO_3M$; e

[000767] M é $-H$ ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

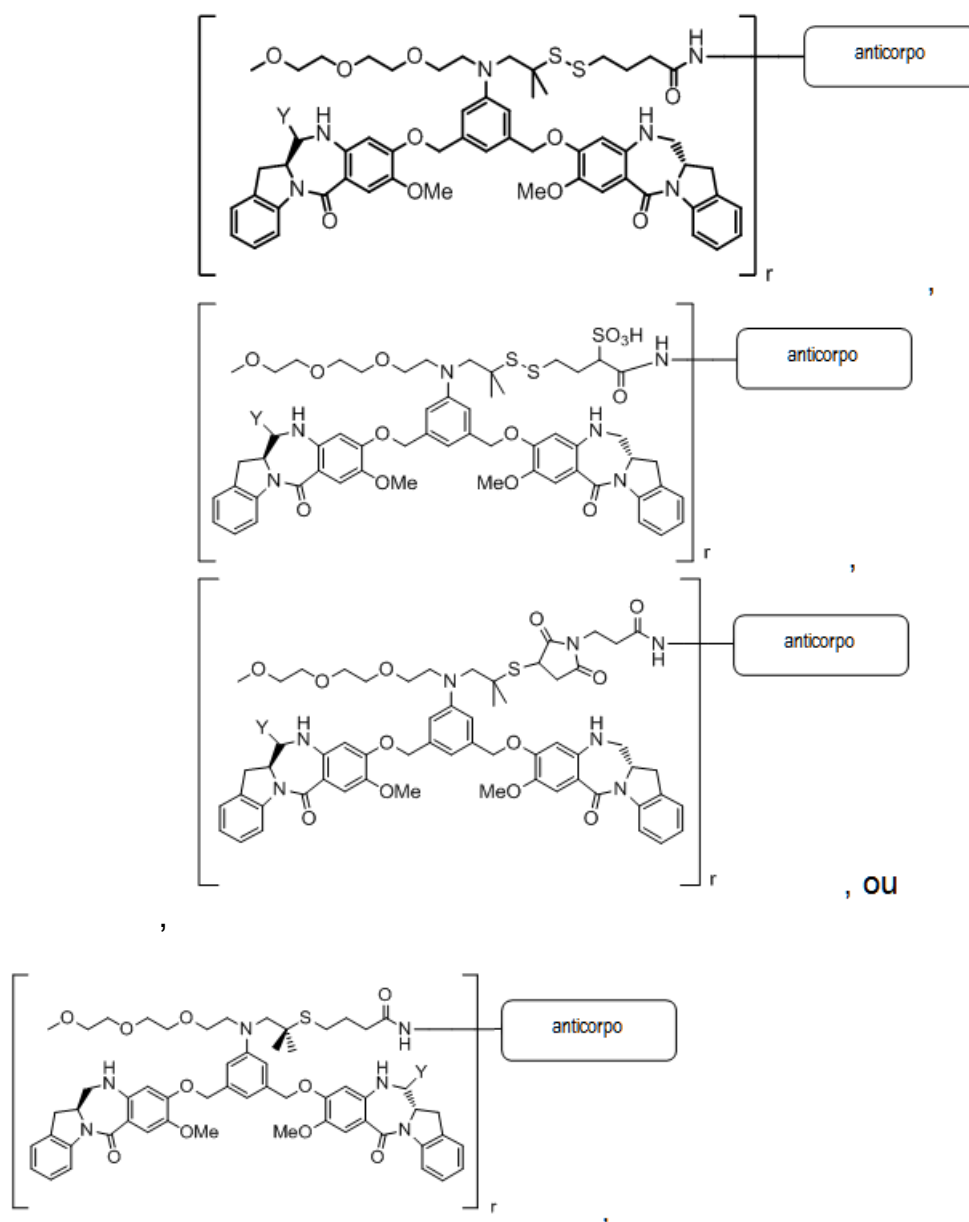
[000768] Em determinadas modalidades, Y é $-SO_3M$; e M é $-H$ ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

[000769] Em determinadas modalidades, o composto citotóxico é produzido reagindo um reagente reativo imina com um composto citotóxico contendo imina da seguinte fórmula:



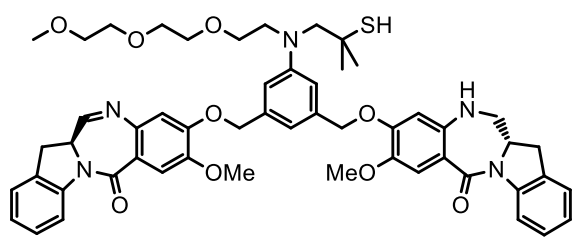
[000770] Em determinadas modalidades, o CBA é huMy9-6.

[000771] Na 26ª modalidade específica, a invenção fornece um método para preparar um conjugado da seguinte fórmula:

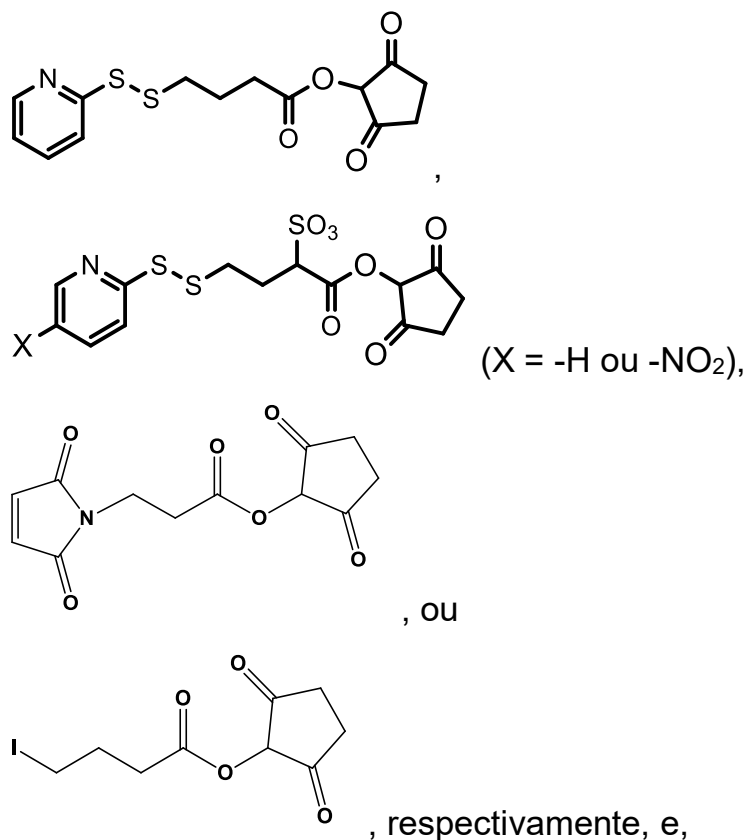


o método compreendendo reagir o CBA com um composto citotóxico contendo imina, um reagente reativo imina, e um agente de ligação cruzada bifuncional compreendendo o grupo de ligação para formar o conjugado, em que:

[000772] o composto citotóxico contendo imina é:



o agente de ligação cruzada bifuncional é:



[000773] o reagente reativo imina é selecionado de: sulfitos (H_2SO_3 , H_2SO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion), mono, di, tri, e tetra- tiofosfatos (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 ou um sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} ou PS_4^{3-} formado com um cátion), ésteres de tiofosfato ($(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$), várias aminas (hidroxil amina (por exemplo, NH_2OH), hidrazina (por exemplo, NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$, $\text{R}^i\text{NH}-\text{R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$, tiosulfato ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formado com um cátion), ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ ou um sal do mesmo formado com um cátion), ácido hidroxâmico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ ou um sal formado com um cátion), hidrazida ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), formaldeído sulfoxilato ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ ou um sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formado com um cátion, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$), nucleotídeo glicado (como GDP-mannose),

fludarabina ou uma mistura dos mesmos, em que R^i and R^i são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 10 átomos de carbono e são substituídos por pelo menos um substituinte selecionado de $-N(R^j)_2$, $-CO_2H$, $-SO_3H$, e $-PO_3H$; R^i and R^i pode ser ainda opcionalmente substituído por um substituinte para uma alquila descrita aqui; R^j é uma alquila linear ou ramificada contendo 1 a 6 átomos de carbono; R^k é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica contendo 1 a 10 átomos de carbono, arila, heterociclila ou heteroarila.

[000774] Em determinadas modalidades, Y é $-SO_3M$; e M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável.

[000775] Em determinadas modalidades, o CBA é huMy9-6.

CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS E CONJUGADOS

[000776] Os compostos citotóxicos e conjugados de agente de ligação à célula-fármaco produzidos pelos métodos da invenção podem ser avaliados para suas capacidades de suprimir proliferação de várias linhagens de célula de câncer *in vitro*. Por exemplo, linhagens de células como a linhagem de carcinoma de colon humano COLO 205, a linhagem de célula de rhabdomyosarcoma RH-30, e a linhagem de célula de mieloma múltiplo MOLP-8 pode ser usada para a avaliação de citotoxicidade destes compostos e conjugados. As células a serem avaliadas podem ser expostas aos compostos ou conjugados por 1-5 dias e as porções de sobrevivência das células medidas em ensaios diretos por métodos conhecidos. Valores IC_{50} pode então ser calculados a partir dos resultados dos ensaios. Alternativamente ou além disso, um ensaio de sensibilidade de linhagem de célula *in vitro*, como aquele descrito pelo U.S. National Cancer Institute (ver Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239, incorporadas aqui por referência) pode ser usado como um dos guias para determinar os tipos de cânceres que podem ser sensíveis para o tratamento com os

compostos ou conjugados produzidos pelos métodos da invenção.

[000777] Exemplos de potência *in vitro* e especificidade-alvo de conjugados de anticorpo-agente citotóxico produzidos pelos métodos da presente invenção é mostrado na FIG. 17. Todos os conjugados são extremamente citotóxicos nas células de câncer positivas para antígenos com um IC_{50} na faixa picomolar inferior. Linhagens de células negativas ao antígeno permaneceram viáveis quando expostas aos mesmos conjugados. Os dímeros de indolinobenzodiazepina mostraram potência específica sendo 160 vezes menos potente quando bloqueado com anticorpo não conjugado huMy9-6 (anti-CD33) (FIG. 17) e 40 menos potente quando bloqueado com anticorpo não conjugado FOLR1 (anticorpo de receptor anti-folato) (resultado não mostrado). Por exemplo, o conjugado huMy9-6-SPDB-1f contendo os adutos bissulfitos mataram as células positivas para o antígeno HL60/QC com um valor IC_{50} de 10,5 pM, enquanto a adição de um excesso de anticorpo não conjugado huMy9-6 reduziu este efeito citotóxico (IC_{50} = 1.69 nM), demonstrando a especificidade do antígeno (FIG. 17A). Além disso, o conjugado huMy9-6-SPDB-1f é ainda altamente potente na direção de ambas as linhagens de células HL60/ATCC com um valor IC_{50} de 21 pM e a linhagem de células NB-4 com um valor IC_{50} de 190 pM (FIGS. 17B e 17C).

[000778] O efeito da conjugação em ligação ao anticorpo foi medido por comparação da ligação de ambos anticorpo não conjugado huMy9-6 e o conjugado huMy9-6-SPDB-1f na direção da linhagem de células HL60/QC (FIG. 18). Análise FACS revelou que não há alteração na capacidade de ligação do conjugado ao anticorpo naked indicando que não há compromisso na ligação devido à conjugação do agente citotóxico ao anticorpo.

[000779] Em um exemplo, eficácia *in vivo* de um conjugado de agente de ligação à célula/agente citotóxico foi medida. Camundongos nude

contendo tumores humanos HL60/QC foram tratados com conjugado huMy9-6-SPDB-1f e regressão de tumor significativa foi observada em várias doses enquanto camundongos não tratados cresceram tumores rapidamente (FIG. 19). A atividade foi observada em doses tão baixas quando 20 µg/kg que é pelo menos 35 vezes menores do que a dose máxima tolerada.

[000780] O efeito de saturação de imina direciona a tolerabilidade é mostrado na tabela 9. Di-imina huFOLR1-fármaco1 foi testado em várias doses todos dos quais demonstraram ser altamente tóxicos deixando somente sobreviventes no grupo mais baixo testado a 50 µg/kg. Em contraste aos conjugados parcialmente reduzidos mono-imina huFOLR1-fármaco2 e huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) demonstraram ter tolerabilidade significativamente melhorada com o conjugado huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1-SPDB-1f) mostrando 100% de sobrevivência animal nas maiores doses testadas de 560 µg/kg.

EXEMPLIFICAÇÃO

EXEMPLO 1

[000781] Anticorpo humanizado My9-6 a 2 mg/ml foi conjugado com 9 equivalentes molares de éster 2-NHS (composto 2) por 3 h a 25°C em 85% PBS, pH 7,4, contendo 15% DMA (v/v) e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em PBS, pH 7,4, para remover fármaco não conjugada, não reagida ou hidrolisada. O conjugado foi dialisado em 10 mM Histidina, 250 mM Glicina, pH 6,5 tampão, contendo 1% sacarose. A reação de conjugado fármaco/anticorpo (DAR) foi determinada como 1,4 DAR baseado em absorbância de UV a 280 e 320 nm e cálculo usando os coeficientes de extinção do fármaco e anticorpo a 280 nm e 320 nm.

[000782] O conjugado foi analisado para o % de monômero por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) em uma coluna TSK-Gel G300SWXL (7,8 mm x 300 mm, 5 µm tamanho de partícula) usando

uma fase móvel isocrática de 400 mM perclorato de sódio, 150 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,0, a 1 ml/min. O percentual de monômero (% de monômero) e agregado foram determinados por monitoramento de absorbância UV de toda espécie de anticorpo a 280 nm e medindo a área sob a curva (AUC) de cada pico de anticorpo. Além disso, o percentual (%) de fármaco 2 em ambos monômero e o agregado foi determinado por monitoramento de absorbância UV de todas as espécies de anticorpo a 320 nm e 280 nm e medindo a AUC de cada pico de anticorpo. O % de monômero do conjugado huMy9-6-2 contendo 1,4 DAR foi 91 %. O % de 2 no monômero foi 80%.

[000783] Para o ensaio de fármaco livre (não conjugada), o conjugado foi extraído em acetona para remover a proteína, seco, e reconstituído em fase móvel e injetado em uma coluna VYDAC 208TP C8 de fase reversa de HPLC (4,6 x 250 mm, 7 µm tamanho de partícula) usando um gradiente linear de 20% acetonitrila e 80% deionizado indo até to 100% acetonitrila, todos contendo 0,025% ácido acético, a 1 ml/min por 48 min e comparado aos padrões de éster metil do fármaco. O percentual de fármaco livre, não conjugada no conjugado foi determinado como <1 % de fármaco não conjugada.

[000784] O conjugado huMy9-6-2 com relação fármaco/anticorpo 1,4 (DAR) foi analisado por espectrometria de massa (MS) após deglicosilação (FIG. 1A). O MS do conjugado mostrou anticorpo não conjugado (D0) no maior pico, com um pico D1 menor (anticorpo com 1 fármaco ligada), e picos D2 e D3 muito menores de 2 e 3 fármacos ligadas por anticorpo. A eficiência de conjugação foi baixa com um DAR conjugado de 1,4 após conjugação com 9 vezes de excesso molar de éster 2-NHS no anticorpo.

EXEMPLO 2

[000785] Para a conjugação de éster 2-NHS (composto 2) usando bissulfito de sódio, o éster 2-NHS (composto 2) foi pré-incubada com

0,9 equivalentes molares de bissulfito de sódio (recém-preparado NaHSO_3 em água deionizada) em 66% DMA (dimetilacetamida) em água por 30 min a 25°C. Anticorpo huMy9-6 a 2 mg/ml foi conjugado com 9 equivalentes molares de éster 2-NHS (com NaHSO_3 adicionado) por 3 h a 25°C em 85% PBS, pH 7,4, 15% DMA (v/v) e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em PBS, pH 7,4 para remover fármaco não reagida ou hidrolisada. O conjugado foi dialisado em 10 mM histidina, 250 mM glicina, 1% sacarose, pH 6,5 de tampão.

[000786] O DAR do conjugado huMy9-6-2 preparado usando bissulfito de sódio foi medido por espectrofotometria no UV a 280 e 320 nm e calculado sendo 3,1 DAR. O % de monômero do conjugado foi 95% e o % 2 no monômero foi 91%. O MS do conjugado preparado usando bissulfito de sódio após deglicosilação mostrou o maior pico de D1 com um fármaco ligada, e ainda picos D2, D3, D4, D5, D6 com 2-6 fármacos ligadas por anticorpo (FIG. 1B).

[000787] O conjugado huMy9-6-2 preparado com bissulfito de sódio mostrou uma incorporação de fármaco muito maior de 3,1 DAR do que o conjugado com 1,4 DAR preparado sem bissulfito de sódio. O MS do conjugado 3,1 DAR preparado com bissulfito de sódio mostrou picos de conjugado de 1-6 fármacos ligadas com o maior pico D1 com 1 fármaco ligada. Em contraste, o MS do 1,4 DAR conjugado preparado sem bissulfito de sódio mostrou o maior pico de anticorpo não conjugado (D0) e picos muito menores D1, D2 e D3 de fármaco conjugada ligada. O % de fármaco no monômero para o conjugado huMy9-6-2 preparado com bissulfito de sódio foi 91%, que foi maior do que 80% de fármaco no monômero para o conjugado huMy9-6-2 preparado sem bissulfito de sódio. A qualidade geral de conjugado para o conjugado huMy9-6-2 preparado com bissulfito de sódio, portanto, foi muito superior do que o procedimento de conjugação tradicional sem bissulfito de sódio.

[000788] As conjugações de ésteres NHS de várias fármacos (1, 2, 3,

e 4) com anticorpo foram realizadas na presença de bissulfito de sódio (NaHSO_3) e foram comparadas com o método tradicional de conjugação sem NaHSO_3 . Os resultados são mostrados na tabela 16. Em todos os casos, a adição de bissulfito de sódio na conjugação mostrou conjugados com qualidade significativamente maior de DAR e % maior de fármaco no monômero do que conjugados preparados sem a adição de bissulfito de sódio.

TABELA 16. Comparações de conjugações de anticorpo com vários fármaco-ésteres NHS sem ou com bissulfito de sódio adicionado (NaHSO_3).

Adição de NaHSO_3	Tipo de fármaco	DAR	% de monômero	% fármaco em monômero
-	2	1,4	91	80
+		3,0	95	91
-	3	0,5	95	35
+		2,5	95	91
-	4	1,0	90	65
+		3,8	90	84
-	1	1,1	95	40
+		2.7	92	87

[000789] O conjugado huMy9-6-2 preparado com bissulfito de sódio mostrou uma citotoxicidade semelhante in vitro ao conjugado preparado sem bissulfito de sódio (FIG. 2). Portanto um conjugado de melhor qualidade de maior DAR e maior % de fármaco em monômero foi preparado usando bissulfito de sódio sem qualquer perda de potência de citotoxicidade. Um conjugado anticorpo anti-CD22 -2 preparado com bissulfito de sódio mostrou citotoxicidade semelhante in vitro ao conjugado preparado sem bissulfito de sódio (FIG. 3).

[000790] O conjugado huMy9-6-2 preparado usando bissulfito de sódio foi analisado por SDS-PAGE não redutor usando um analisador chip gel. O conjugado mostrou somente a banda do anticorpo intacto; nenhuma banda de cadeia pesada e cadeia leve foi observada, mostrando uma vantagem esperada que o bissulfito de sódio adicionado não causou qualquer redução não desejada de ligações nativas dissulfeto intercadeia no anticorpo.

[000791] Éster 2-NHS ou ésteres SPDB-NHS de 3, 4, 1, e 5 foram pré-incubados com 0,5 a 3 equivalentes molares de bissulfito de sódio (recém-preparado NaHSO₃ em água deionizada) em 66-98% DMA (dimetilacetamida) em água de 15 min por 4 h a 25°C. Algumas destas reações foram ainda deixadas durante a noite a 4°C e usadas para conjugações 20 h depois.

[000792] O éster 2-NHS em DMA tratado com bissulfito de sódio ou sem bissulfito de sódio adicionado foi analisado por HPLC usando uma coluna de fase reversa VYDAC C8 com um gradiente linear de 20% acetonitrila e 80% água deionizada indo até 100% acetonitrila, todos contendo 0,025% ácido acético, em 1 ml/min por 48 min. Como mostrado em FIG. 4, éster 2-NHS parente eluiu a ~23 min. Após 30 min de tratamento com 0,9 equivalentes molares de NaHSO₃ em 66% DMA em água a 25°C, uma maioria do 2-NHS foi convertido na forma sulfonada, mais polar daquele eluído a ~14 min. Inesperadamente, nenhum pico indesejável de hidrolisado sulfonado 2 foi observado. Portanto, uma reação surpreendentemente favorável de bissulfito de sódio para a adição à ligação de imina sem reação com o éster NHS foi observada.

[000793] De modo semelhante os ésteres de NHS fármaco são tratados com reagente imina reativas além do bissulfito de sódio antes da conjugação com anticorpo. Uma abordagem de conjugação alternativa é tratar uma mistura de fármaco-éster NHS e anticorpo com

bissulfito de sódio ou outro reagente reativo imina.

EXEMPLO 3

[000794] O conjugado anticorpo ligado a dissulfeto-SPDB-1 foi preparado usando 1-SPDB-éster NHS sintetizado (composto 1c). O 1-SPDB-éster NHS foi pré-tratado com 3 equivalentes molares de bissulfito de sódio (usando uma solução recém-preparada de NaHSO₃ em água) em 96-98% DMA em água para 4-5 h a 25°C. O 1-SPDB-éster NHS tratado com bissulfito de sódio em DMA foi analisado usando coluna de HPLC de fase reversa VYDAC C8 usando um gradiente linear de 20% acetonitrila e 80% água deionizada contendo 0,025% ácido acético a 1 ml/min por 48 min. A análise de HPLC de fase reversa mostrou somente a reação desejada de adição de bissulfito à ligação imina sem a reação indesejada de bissulfito com o éster NHS.

[000795] Para conjugação, um anticorpo humanizado a 2 mg/ml foi reagido com 5-7 equivalentes molares de 1-SPDB-éster NHS (pré-tratado com NaHSO₃) por 6 h a 25°C em 85% PBS, pH 7,4, tampão aquoso contendo 15% *N,N*-dimetilacetamida (DMA) e então purificado por uma coluna G25 gel filtração em PBS, pH 7,4, para remover fármaco não reagida ou hidrolisada. Os conjugados anticorpo humanizado-SPDB-1 foram dialisados em 10 mM Histidina, 250 mM Glicina, 1% sacarose, pH 6,5 tampão. A relação fármaco/anticorpo (DAR) dos conjugados foi medida sendo 2,2-2,9 por medições de absorbância UV a 280 e 320 nm e usando os coeficientes de extinção do fármaco e anticorpo a 280 nm e 320 nm. O percentual de monômero na preparação conjugado foi determinado por SEC (Cromatografia por exclusão de tamanho) como 90%. Baseado na absorbância UV do pico de monômero em SEC foi ainda demonstrado que o pico do monômero conjugado tinha moléculas de fármaco ligadas. O % de fármaco não conjugada por extração de acetona e HPLC de fase reversa demonstrou ser menos do que 1%.

[000796] A MS do conjugado de anticorpo-SPDB-1 desglicosilado preparado com bissulfito de sódio adicionado antes da conjugação mostrou um conjugado muito superior do que o obtido sem conjugação a bissulfito de sódio (FIG. 5). O MS do conjugado preparado sem bissulfito de sódio teve uma média de 1,4 1/Ab e espécie de anticorpo com até três moléculas de 1 ligado (FIG. 5A). Em contraste, o MS do conjugado preparado com bissulfito de sódio mostrou uma média de 2,5 1/Ab e espécie de anticorpo com até sete moléculas 1 ligadas (FIG. 5B).

[000797] O conjugado anticorpo ligado a dissulfeto-SPDB-1 preparado usando bissulfito de sódio mostrou somente anticorpo intacto por análise SDS-PAGE não redutor de chip gel. O ensaio de gel chip foi realizado usando Agilent Protein 230 Protein Chip e analisado usando um Agilent 2300 Bioanalyzer. Nenhuma banda de cadeia pesada e cadeia leve foi observada, mostrando uma vantagem inesperada que adicionou bissulfito de sódio não causou qualquer redução indesejada de ligações nativas de dissulfeto intercadeia de anticorpo (FIG. 6). o fármaco ligada obtida no conjugado anticorpo-SPDB-1 preparado usando bissulfito de sódio ainda demonstrou surpreendentemente que o ligante dissulfeto no conjugado foi estável ao bissulfito de sódio adicionado.

EXEMPLO 4

[000798] Para a preparação do conjugado, 1f-SPDB-éster NHS (composto 1c, FIG. 7) foi pré-incubado com 3 equivalentes molares de bissulfito de sódio (recém-preparado NaHSO_3 em água deionizada) em 96% DMA (dimetilacetamida) em água por 5 h a 25°C e então incubado durante a noite a 4°C até necessário para conjugação. Anticorpo humanizado a 2-3 mg/ml foi derivatizado com 8 equivalentes molares de 1f-SPDB-éster NHS na ausência ou presença de bissulfito de sódio (-/+ NaHSO_3) por 4 h a 25°C em 95% 50 mM HEPES, pH 8,5, tampão aquoso contendo 5% DMA (v/v) e então ambos foram purificados por

colunas dessalinizantes G25 em PBS, pH 7,4, para remover o fármaco hidrolisado não reagido. Os conjugados foram dialisados em 10 mM histidina, 250 mM glicina, 1% sacarose, pH 6,5 tampão. O DAR do conjugado foi medido por espectrofotometria UV a 280 e 320 nm. O % de monômero e o % de fármaco no monômero no conjugado foram determinados por SEC. o fármaco não conjugada no conjugado foi determinada por HPLC fase reversa após extração com acetona. Estas conjugações foram realizadas com vários anticorpos humanizados.

EXEMPLO 5

[000799] Ao fármaco conjugado com tiol com ligante dissulfeto reativo incorporado no anticorpo, mAb humanizado a 8 mg/ml é derivatizado com 4-6 equivalentes molares de heteroligante bifuncional SPDB por 1,5 h a 25°C em 90% PBS, pH 7,5, tampão aquoso com 5% DMA (v/v) e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em 35 mM citrato, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 5,5 tampão para remover ligante hidrolisado não reagido. A LAR (relação ligante anticorpo) é medida por absorbância UV a 280 e 343 nm sem e com 50 mM ditiotretitol adicionado (para medir anticorpo total e SPy liberável). O SPDB-anticorpo modificado a 2 mg/ml é reagido com 2 equivalentes molares de fármaco tiol tratada com bissulfito de sódio por ligante por 2 a 20 h a 25°C em 85-90% de 50 mM fosfato de potássio, 50 mM NaCl, pH 7,5 tampão e então purificada por uma coluna dessalinizante G25 em PBS, pH 7,4, para remover fármaco não reagido hidrolisado. A DAR do conjugado anticorpo-SPDB-fármaco é medida por absorbância UV a 280 e 320 nm e o percentual de monômero e o percentual de fármaco no monômero na preparação do conjugado é determinado por SEC.

EXEMPLO 6

Preparação de huMy9-6-sulfo-SPDB-1 (método de 2-etapas)

My9-6-sulfo-SPDB-1

[000800] Uma reação contendo 6 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 9 equivalentes molares ligante sulfo-SPDB (20 mM estoque em DMA) foi incubado por 3 h a 25 °C em 50 mM EPPS tampão pH 8. Ligante não reagido foi removido usando uma coluna dessalinizante NAP (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) e a relação de ligante ao anticorpo (LAR) foi determinada sendo 3,7 baseado em concentração de anticorpo e concentração de tiopiridina liberada por DTT ou UV-Vis ($\epsilon_{343\text{ nm}} = 8,080\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para 2-tiopiridona).

[000801] Sulfo-SPDB modificado huMy9-6 foi diluído a 2 mg/ml em 50 mM EPPS pH 8,5, 10% v/v DMA, e reagido com 2 equivalentes molares de composto 1d por ligante (5 mM estoque em DMA; 7,4 equivalentes por anticorpo) por 3 h a 25°C.

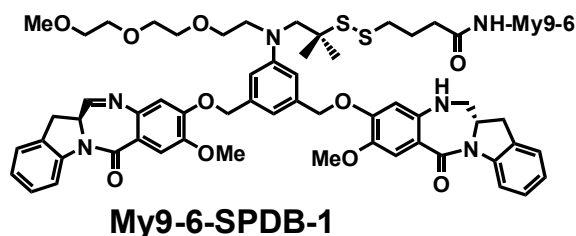
[000802] Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50µM bissulfito de sódio a pH 6,2 usando uma coluna dessalinizante (G-25 Sephadex, grau fino, GE Healthcare).

[000803] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 2,9 moléculas de composto 1 ligado por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para o composto 1, e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticorpo My9-6), 97,8% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho), <1% composto 1 não conjugado (por extração de acetona/HPLC fase reversa), um rendimento de 60% baseado na quantidade de anticorpo usado, e um rendimento geral de 18% baseado na quantidade de composto 1d usado. O conjugado preparado usando este método poderia ser concentrado (por dispositivo de agitação de

célula ou filtro de centrifugação Amicon) a >3 mg/ml sem precipitação do conjugado.

EXEMPLO 7

Preparação de huMy9-6-SPDB-1



Método 1 (Método reagente de uma etapa):

[000804] Uma reação contendo 2 mg/mL de anticorpo huMy9-6 e 7 equivalentes molares 1-SPDB-NHS (pré-tratado com 5 vezes de excesso de bissulfito de sódio em 90:10 DMA:água, v/v por 1 h a 25°C e então durante a noite a 4°C) em 50 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico) pH 8,5 tampão e 10% v/v DMA (*N,N*-Dimetilacetamida) cosolvente foi deixado incubar por 3 h a 25 °C.

[000805] Após a reação, o conjugado foi purificado e o tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween, 50 µM formulação de bissulfito de sódio tampão, usando NAP colunas dessalinizantes (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A diálise foi realizada no mesmo tampão por 4 horas em temperatura ambiente utilizando um cassete de diálise Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO).

[000806] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 4,0 moléculas do composto 1 ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para composto 1, e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticorpo My9-6), 92% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% composto 1 não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa) um rendimento de 72% baseado na quantidade de anticorpo usado, um rendimento geral 40%

baseado na quantidade de 1-SPDB-NHS usada, e uma concentração de proteína final de 1,0 mg/ml.

Método 2 (método de duas etapas):

[000807] Uma reação contendo 4,8 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 6 equivalentes molares ligante SPDB (18,5 mM estoque em etanol) foi incubada por 3 h a 25°C em PBS pH 7,4. Ligante não reagido foi removido usando uma coluna dessalinizante NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare) e a relação de ligante ao anticorpo (LAR) foi determinada sendo 4,0 baseado na concentração de anticorpo e concentração de 2-tiopiridona liberada por DTT por UV-Vis ($\epsilon_{343 \text{ nm}} = 8,080 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para 2-tiopiridona).

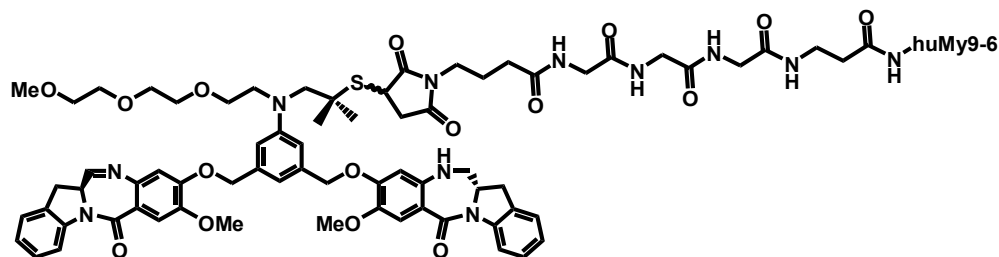
[000808] SPDB modificado huMy9-6 foi diluído a 2 mg/ml em 50 mM EPPS pH 8,5, 10% v/v DMA e reagido com 1,75 equivalentes molares de composto 1d por ligante (5 mM estoque em DMA; 7 equivalentes por anticorpo) por 3 h a 25°C.

[000809] Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50µM bissulfito de sódio a pH 6,2 usando a coluna dessalinizante (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare).

[000810] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 3,8 moléculas do composto 1 ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15,484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para o composto 1, e $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 207,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticorpo My9-6), 91,6% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% do composto 1 não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa), um rendimento de 40% baseado na quantidade de anticorpo usado, um rendimento geral 22% baseado na quantidade de composto 1d usado, e uma concentração final de proteína de 0,5 mg/ml.

EXEMPLO 8

Preparação de huMy9-6-CX1-1-1



huMy9-6-CX1-1-1

Método 1 (método in-situ de reagente de uma etapa):

[000811] Uma solução de DMA contendo 1,9 mM composto 1d, 1 mM CX1-1 heteroligante bifuncional com grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) e maleimida, e 20 mM diisopropila etil amina (DIPEA) foi deixado reagir em temperatura ambiente por 8 min. Então 3 mM ácido propionico maleimido (MPA) foi adicionado para extinguir excesso de composto 1d. A mistura de reação 1-CX1-1-NHS foi armazenada congelada a -80°C , e posteriormente no descongelamento foi adicionada em duas porções a uma solução tamponada de huMy9-6 a 25°C (2 mg/ml, 100 mM EPPS, pH 8,0, 10% v/v DMA); 4,8 equivalentes molares por anticorpo (baseado na concentração de ligante) seguido por 4,2 equivalentes 30 min posteriormente. Após 2 h de reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50 μM bissulfito de sódio em pH 6,2 usando uma coluna dessalinizante (proteína Quick-spin, resina fina G-25, Roche), diálise, e finalmente filtração estéril a 0,22 μm .

[000812] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 3,3 moléculas do composto 1 ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para composto 1, e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticorpo My9-6), 95% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% composto 1 não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa), um rendimento de 45% baseado na quantidade do anticorpo usada, um rendimento geral 17%

baseado na quantidade de composto 1d usada, e uma concentração final de proteína de 0,7 mg/ml.

Método 2 (método de uma etapa):

[000813] A uma solução tamponada de anticorpo huMy9-6 (2 mg/ml, 50 mM EPPS, pH 8,5, 8% v/v DMA) foi adicionado 14 equivalentes molares de composto 1d (5 mM estoque em DMA) seguido por 7 equivalentes molares de CX1-1 ligante (15 mM solução estoque em etanol) e incubada por 3 h a 25°C.

[000814] Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM Glicina, 10 mM Histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50 µM bissulfito de sódio a pH 6,2 usando uma coluna dessalinizante (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare), seguido por 2 × diálise a 4°C em cassetes de diálise Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20,000 MWCO).

[000815] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 3,4 moléculas do composto 1 ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para composto 1, e $\epsilon_{280\text{ nm}} = 207,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticorpo My9-6), 90% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho, TSK3000, TOSOH Biosciences), <1% composto 1 não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa), um rendimento de 44% baseado na quantidade do anticorpo usada, um rendimento geral de 11% baseado na quantidade de composto 1d usada, e uma concentração final de proteína de 1,48 mg/ml.

EXEMPLO 9

Análise MS de My9-6-SPDB-1f desglicosilado

[000816] My9-6-SPDB-1f foi preparado por conjugação de um éster NHS contendo composto 1f diretamente às lisinas de anticorpo (ou seja, método reagente de uma etapa como descrito acima), ou conjugando anticorpo 1d a um anticorpo modificada por ditiopiridina (ou seja, método

de duas etapas como descrito acima). Análise de espectrometria de massa (MS) do My9-6-SPDB-1f desglicosilado foi então realizada como acima.

[000817] O método reagente de uma etapa gerou um conjugado com 0-9 modificações de composto 1f, uma distribuição de fármaco conjugada assimétrica, e uma quantidade significativa de anticorpo não conjugado. Por outro lado, o conjugado preparado pelo método de duas etapas teve um perfil MS com 0-6 modificações de composto 1f, uma distribuição de fármaco conjugada simétrica, e muito pouco anticorpo não conjugado. Ver FIG. 12. Ambos os conjugados tiveram uma relação média de composto 1f/anticorpo de ~4 por análise UV-vis.

EXEMPLO 10

Efeito de pH em síntese de duas etapas de My9-6-sulfo-SPDB-1

[000818] Dados MS para My9-6-sulfo-SPDB-1f preparado usando um método de duas etapas em diferentes condições de pH foi mostrado em FIG. 13. Resumidamente, My9-6-sulfoSPDB (3,7 ligante/anticorpo) foi reagido com 3 equivalentes de composto 1d por ligante (ou cerca de 11,1 equivalentes por anticorpo) por 18 h a pH 6, 7, 8, e 8,5. Os dados MS mostraram uma redução em ligante não reagido (260 picos satélite amu) com pH da reação aumentando. Assim pareceu que o pH afeta a reação de conjugação na síntese de conjugado My9-6-sulfo-SPDB-1f. Especificamente, um pH de > 8 é requerido para composto 1d totalmente reagir com o ligante sulfo-SPDB no anticorpo.

EXEMPLO 11

Efeito de relação Composto/Ligante em síntese de duas etapas de chKTI-sulfo-SPDB-1

[000819] A FIG. 14 mostra dados MS para chKTI-sulfo-SPDB-1 preparado usando um método de duas etapas com diferentes relações de composto 1d/ligante. chKTI-sulfoSPDB (3,7 ligante/anticorpo) foi reagido com 1,1, 1,3, 1,5 ou 2 equivalentes de composto 1d por ligante

por 3 h, a 25°C, pH 8,5. O MS mostrou uma redução em ligante não reagido (260 picos satélite amu) com aumento de equivalentes do composto 1d por ligante. Parece que sob esta condição, uma relação de composto **1d**/ligante de >1,3 é requerido para totalmente reagir com o sulfo-SPDB ligante no anticorpo. Aumentando os do composto **1d** acima 1,5 por ligante levou a fragmentação de anticorpo aumentada (14-19%) enquanto 1,1-1,3 composto 1d/ligante não causou fragmentação de anticorpo significativa.

EXEMPLO 12

Preparação de conjugado anticorpo-SPDB-fármaco

[000820] Composto 1c foi pré-tratado com 3 equivalentes molares de bissulfito de sódio (usando uma solução recém-preparada de NaHSO₃ em água) em 96-98% DMA em água por 4-5 hrs a 25°C. Para conjugação, o anticorpo humanizado a 2 mg/mL foi reagido com 5-7 equivalentes molares de composto **1c** (pré-tratado com NaHSO₃) por 6 h a 25°C em 85-90% PBS, pH 7,4, tampão aquoso, ou 50 mM HEPES, pH 8,5, tampão aquoso, contendo 10-15% *N,N*-dimetilacetamida (DMA) e então purificado por uma coluna G25 gel filtração em PBS, pH 7,4, para remover composto de fármaco não reagido hidrolisado. Os conjugados anticorpo humanizado-SPDB-fármaco foram dialisados em 10 mM Histidina, 250 mM Glicina, 1% sacarose, pH 6,5 tampão. A relação de Anticorpo fármaco (DAR) dos conjugados foi medida sendo 2,2-2,9 por medidas de absorbância UV a 280 e 320 nm e usando os coeficientes de extinção do fármaco e anticorpo a 280 nm (215,000 M⁻¹cm⁻¹) e 320 nm (9137 M⁻¹cm⁻¹). O percentual de monômero nos conjugados foi determinado como >90% por SEC (Cromatografia por exclusão de tamanho) usando coluna TSK-Gel G300SWXL (7,8 mm × 300 mm, 5 µm tamanho de partícula). Baseado na absorbância UV do pico de monômero em SEC foi ainda demonstrado que os picos de monômero conjugado tinham moléculas do fármaco ligadas. Para o

ensaio de fármaco livre (não conjugada), o conjugado foi extraído com acetona para remover proteína, seca, e reconstituída em fase móvel e injetada em uma coluna de VYDAC 208TP C8 HPLC fase reversa (4,6 × 250 mm, 7 µm tamanho de partícula) e comparado aos padrões. O percentual de composto de fármaco livre no conjugado foi determinado como <0,5% do composto de fármaco conjugado.

Preparação de conjugado de Ab-SPDB-2a humanizado:

[000821] Ab humanizado a 8 mg/mL foi derivatizado com 4-6 equivalentes molares de heteroligante bifuncional SPDB por 1,5 h a 25°C em 95% PBS, pH 7,4, contendo 5% DMA (v/v), e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em tampão citrato (35 mM tampão citrato, pH 5,5, contendo 2 mM EDTA, 150 mM NaCl) para remover ligante não reagido. A LAR (relação Ligante anticorpo) foi medida usando absorvância UV a 280 e 343 nm sem e com 50 mM adição de ditioneitol (para medir anticorpo total e SPy liberado por ditioneitol) e foi determinado sendo 2,7-4,1 LAR. O SPDB-anticorpo modificado a 2 mg/mL foi reagido com 2 equivalentes molares de composto 2a (sal HCl) por SPDB ligado por 20 h em temperatura ambiente em 85% tampão citrato, 15 % DMA (v/v) e então purificado por uma coluna dessalinizante G25 em PBS, pH 7,4 para remover composto de fármaco não conjugado. O DAR do conjugado Ab-SPDB-2a humanizado final foi medido por espectrofotometria UV a 280 e 350 nm e calculado sendo ~1,7-2,1 DAR. O percentual de monômero e composto de fármaco ligado no monômero no conjugado foi determinado por HPLC usando coluna SEC (Cromatografia por exclusão de tamanho). Ver FIG. 16.

EXEMPLO 13

[000822] Uso de reativos covalentes imina para melhorar especificações de conjugado Ab-fármaco (% de monômero e carga de fármaco)

[000823] Formação de aduto foi realizada com 5 equivalentes molares

de reator imina por NHS-BMPS-1 em 90% DMSO/ 10% PBS pH 7,4 por 4 hr a 25°C. A mistura de reação foi então adicionada ao anticorpo huMy9-6 (4 equivalentes molares do fármaco, 2 mg/ml, 10% v/v DMSO, 50 mM HEPES tampão, pH 8,5, 5 h, 25°C). Conjugados preparados usando hidrosulfito de sódio, bissulfito de sódio, ou metabissulfito de sódio tinham relações semelhantes de fármaco/Ab e % de monômero, enquanto conjugados preparados sem tratamento aditivo levou a incorporação muito baixa do fármaco.

EXEMPLO 14

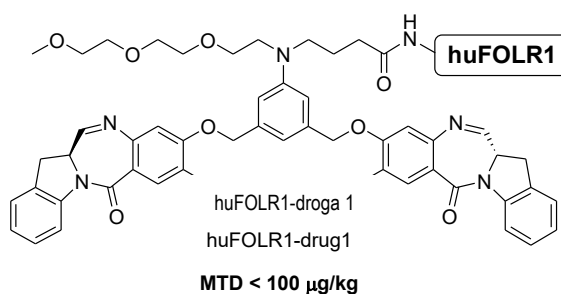
Estudo de tolerabilidade *in vivo* de Conjugados huFOLR-1

[000824] A tolerabilidade *in vivo* de conjugados huFOLR-1 foi investigada em camundongos fêmeas CD-1. Os animais foram observados por sete dias antes do início do estudo e demonstraram estar livres de doença ou enfermidade. Os camundongos foram administrado com uma única injeção *i.v.* do conjugado contendo bissulfito e os animais foram monitorados diariamente para perda de peso corporal, morbidade ou mortalidade. A tabela 9 mostra que para a huFOLR1-fármaco1, o conjugado foi tolerado em somente a menor dos testada de 50 µg/kg. Em contraste, ambos os conjugados mono-imina huFOLR1-fármaco2 e huFOLR1-SPDB-1f demonstraram ser melhor tolerados com uma dose máxima tolerada de <198 µg/kg e >560 µg/kg respectivamente.

Tabela 9. Dados de comparação de tolerabilidade para (A) huFOLR1-fármaco 1, (B) huFOLR1-fármaco 2, e (C) conjugados huFOLR1-SPDB-1f.

A)

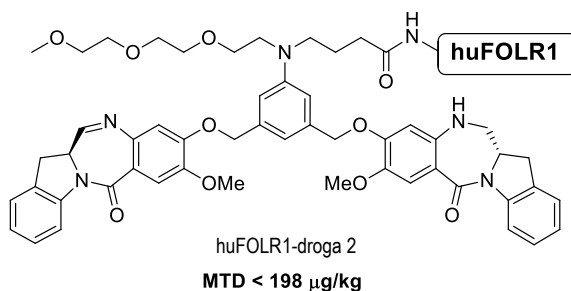
Dose µg/kg)	% Sobrevivência
50	100
100	0
200	0



300	0
400	0

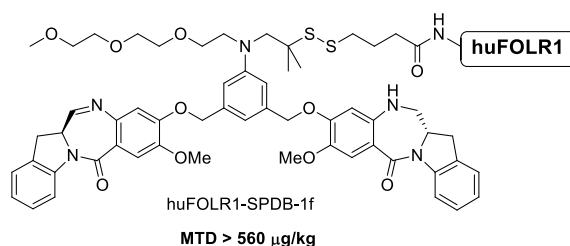
B)

Dose $\mu\text{g/kg}$	% Sobrevivência
66	100
132	100
198	50
264	25



C)

Dose $\mu\text{g/kg}$	% Sobrevivência
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



EXEMPLO 15

Efeito de Propileno Glicol na Formulação e Conjugação

[000825] Este exemplo demonstra que as reações de conjugação objeto conduzidas na presença de propileno glicol como cossolvente não mostram precipitação dos conjugados, e tão alto como 40% (e possivelmente ainda maior) propileno glicol pode ser usado sem uma redução no % de monômero do conjugado resultante (na presença de 2% dimetilacetamida – dados não mostrados).

[000826] Mais importante, a presença de propileno glicol durante purificação leva a aumentos significativos no rendimento (Tabela 10).

[000827] Embora não desejando se vincular a qualquer teoria particular, os Requerentes acreditam que uma das fontes primárias dos problemas durante a conjugação dos conjugados objetos é a

hidrofobicidade inerente dos componentes moleculares dos conjugados. Isto pode pelo menos parcialmente explicar os rendimentos baixos purificados e algumas vezes perfis de distribuição de massa anormais observados com as conjugações objeto.

[000828] É ainda notório que a adição de isopropanol durante a cromatografia por exclusão de tamanho dos conjugados objetos enormemente reduz a aparente população de agregado. Esta observação sugere que os cossolventes hidrofóbicos pequenos podem aumentar a solubilidade do fármaco e do conjugado da invenção.

[000829] Assim as reações de conjugação objeto, as etapas de purificação após a reação, e/ou a formulação dos conjugados formados são preferencialmente realizadas na presença de cossolventes hidrofóbicos pequenos, como propileno glicol (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45%).

[000830] Anticorpo-sulfo-SPDB foi preparado de acordo com os métodos anteriormente descritos pela adição da forma éster N-hidroxisuccinimidil (NHS) de sulfo-SPDB ao anticorpo (huMy9-6) em água contendo 3% DMA, e tamponado a pH 8,5 por 3 horas. O intermediário resultante (anticorpo-sulfo-SPDB) foi purificado over por Sephadex para remover excesso ligante. Anticorpo e ligante foram quantificados por espectroscopia UV-vis medindo a absorbância a 280 nm na ausência de redutor, e a 343 nm na presença de ~50 mM DTT para medir liberação de 2-tiopiridina do ligante conjugado.

[000831] Ao fármaco conjugada, o anticorpo-sulfo-SPDB preparado acima foi reagido a 2 mg/mL anticorpo com um excesso molar de 2 vezes do composto 1d na presença de cossolventes indicados, e com o pH mantido a 8,5 com tampão EPPS (concentração final 60 mM). Dimetilacetamida (SAFC) e propileno glicol (Alfa Aesar) foram usados como recebido sem outra purificação. Todos os tampões foram esterilizados pela passagem por filtro de 0,22 micron (Corning) e água

foi purificada por osmose reversa/deionização. As reações foram incubadas a 25 °C por 3 hrs e então purificadas usando colunas descartáveis G25 Sephadex (Nap 25, GE Healthcare) na formulação tampão consistindo em 10 mM histidina, 250 glicina, 1% sacarose, 0,01% polissorbato 20, 50 µM bissulfito de sódio e tamponado a pH 6,2, bem como o percentual indicado de propileno glicol (v/v).

[000832] Os rendimentos de reação e carga de fármaco foram determinados por espectroscopia de absorbância. Todas as amostras mostraram >96% de monômero por Cromatografia analítica por exclusão de tamanho.

[000833] A Tabela 10 abaixo mostra o % de rendimento de conjugação como uma função de propileno glicol na mistura de reação ou formulação. Anticorpo-sulfo-SPDB-1 foi preparado por reação de composto 1d com anticorpo-sulfo-SPDB por 4 horas a pH 8,5 (componentes não aquosos como indicado) seguido por purificação em G25 Sephadex.

Tabela 10

		Formulação	
		Todas aquosas	15% Propileno glicol
Reação	0% Propileno glicol + 10% DMA	59	79
	30% Propileno glicol + 2% DMA	53*	83

* um precipitado branco fino foi observado em cima da coluna Sephadex após purificação

EXEMPLO 16

Preparação de huMy9-6-sulfo-SPDB-1d usando o ligante altamente reativo 4-nitroPy-sulfo-SPDB

[000834] Uma reação contendo 6 mg/mL anticorpo huMy9-6 e 5 equivalentes molares do ligante altamente reativo *N*-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato (20 mM estoque em etanol) foi incubada por 3 h a 25°C em 50 mM EPPS tampão em pH 8. Ligante não reagido foi

removido usando uma coluna dessalinizante NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). A relação de ligante para anticorpo (LAR) foi determinada sendo cerca de 2,3 baseado em concentração de anticorpo e concentração de nitropiridina-2-tiona liberada por DTT concentração por UV-Vis ($\epsilon_{394 \text{ nm}} = 14205 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para 2-tio-4-nitropiridona).

[000835] Ligante modificado huMy9-6 foi diluído a 2 mg/mL em 50 mM HEPES tampão em pH 8,5, 10% v/v DMA, e reagiu com 2 equivalentes molares de composto 1d por ligante (5 mM estoque em DMA; 4,6 equivalentes por anticorpo) por 30 min a 25°C. A conclusão de reação de troca de dissulfeto foi determinada monitorando aumento de absorbância em 394 nm por UV. Após a reação, o conjugado foi purificado e tampão trocado em 250 mM glicina, 10 mM histidina, 1% sacarose, 0,01% Tween-20, 50 μM bissulfito de sódio em pH 6,2 usando a coluna dessalinizante (G-25 Sephadex, grau fino, GE Healthcare).

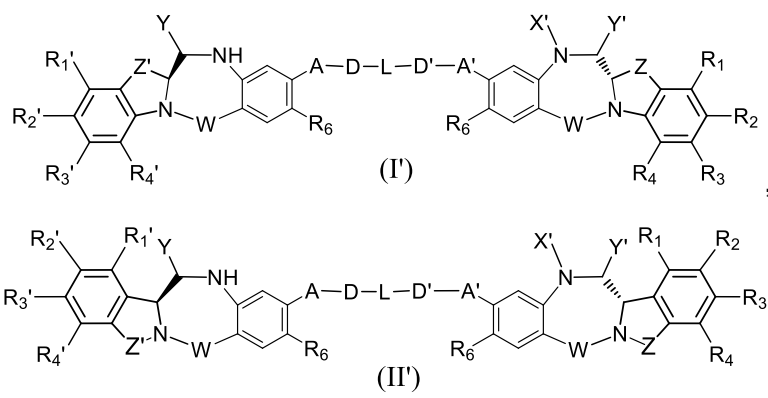
[000836] O conjugado purificado demonstrou ter uma média de 2,1 moléculas de 1d ligadas por anticorpo (por UV-Vis usando coeficientes de extinção molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15,484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ por 1d, e $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 207,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ for huMy9-6), 98% de monômero (por Cromatografia por exclusão de tamanho), <1% de 1d não conjugado (por extração por acetona/HPLC fase reversa), a 70% rendimento de proteína, e um rendimento geral de 32% de 1d. Ver FIG. 28.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação a célula (CBA) conjugado a um composto citotóxico com um grupo ligante, caracterizado pelo fato de que compreende reagir um composto citotóxico modificado com um CBA modificado em um pH de 4 a 9, em que:

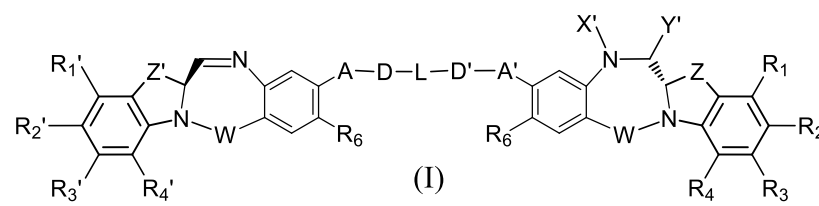
(a) o CBA modificado compreende um resíduo de um agente de reticulação bifuncional ligado ao CBA e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo tiol; e

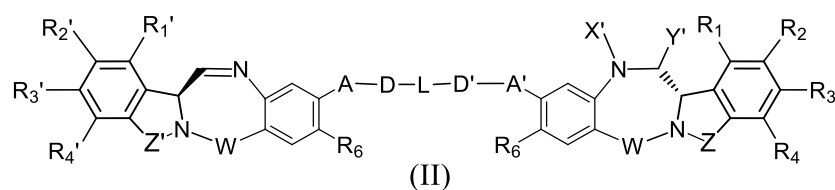
(b) o composto citotóxico modificado compreende um grupo tiol e é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



em que:

o composto citotóxico modificado é produzido pela reação de um composto citotóxico contendo imina que suporta o grupo tiol com reagente reativo a imina, e em que o composto citotóxico contendo imina é representado por uma das seguintes fórmulas:





ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

o grupo $-C(Y)-N(H)-$ nas fórmulas (I') e (II') resulta da reação do reagente reativo à imina com o composto citotóxico contendo imina;

X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos;

R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída tendo 1 a 4 átomos de carbono;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de

polietileno glicol $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$, halogênio, guanidínio $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, $-\text{OR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NCO}$, $-\text{NR}'\text{COR}''$, $-\text{SR}$, um sulfóxido representado por $-\text{SOR}'$, uma sulfona representada por $-\text{SO}_2\text{R}'$, um sulfonato $-\text{SO}_3^-\text{M}^+$, um sulfato $-\text{OSO}_3^-\text{M}^+$, uma sulfonamida representada por $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$, ciano, um azido, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$, $-\text{OCONR}'\text{R}''$;

R, para cada ocorrência, é independentemente selecionado do grupo que consiste em $-\text{H}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

R' e R'' são cada um independentemente selecionados de $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{COR}$, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

n é um inteiro de 1 a 24;

W é selecionado de $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, CH_2 , BH , SO e SO_2 ;

R_6 é $-\text{H}$, $-\text{R}$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, ou, halogênio;

Z e Z' são independentemente selecionados de $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-CR}_7\text{R}_8\text{-(CH}_2)_{n'a'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-NR}_9\text{-(CH}_2)_{n'a'}\text{-}$, $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-O-(CH}_2)_{n'a'}\text{-}$ e $-(\text{CH}_2)_{n'}\text{-S-(CH}_2)_{n'a'}\text{-}$;

n' e $n'a'$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de

0, 1, 2 e 3;

R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- e -CRR'N(R_5)-,

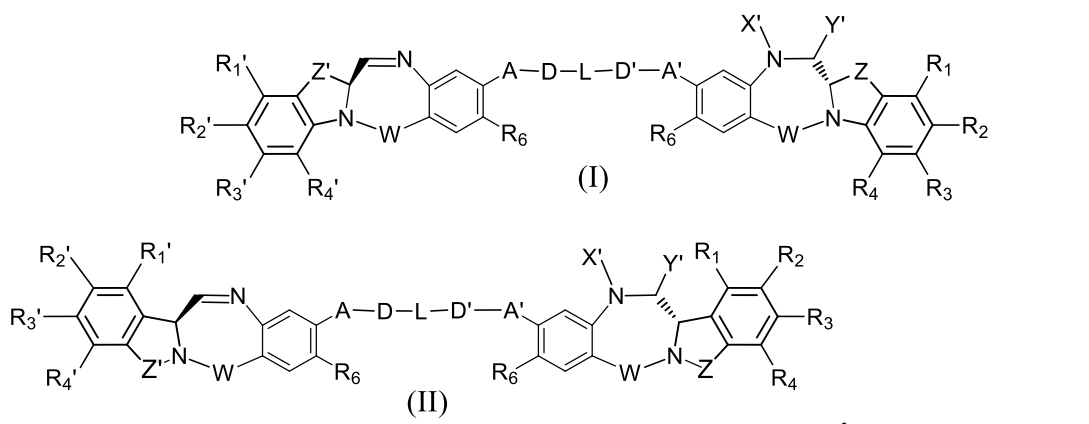
R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono;

D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, ou é uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída; e

o reagente reativo à imina é selecionado do grupo que consiste em um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion) e um ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion).

2. Método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação a célula (CBA) conjugado a um composto citotóxico com um grupo ligante, caracterizado pelo fato de que compreende reagir o CBA com um composto citotóxico contendo imina, um reagente reativo de imina e um agente de reticulação bifuncional compreendendo o grupo de ligação para formar o conjugado, em que o composto citotóxico contendo imina é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo:



em que:

X' é selecionado de $-\text{H}$, um grupo de proteção amina, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros

contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos;

R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída tendo 1 a 4 átomos de carbono;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' e R₄' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e o grupo de ligação;

R, para cada ocorrência, é independentemente selecionada do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído

de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol -(CH₂CH₂O)_n-R^c, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

n é um inteiro de 1 a 24;

W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, ou halogênio;

Z e Z' são independentemente selecionados de -(CH₂)_{n'}-, -(CH₂)_{n'}-CR₇R₈-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-NR₉-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-O-(CH₂)_{na'}- e -(CH₂)_{n'}-S-(CH₂)_{na'}-;

n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

R₇ e R₈ são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietileno glicol -(OCH₂CH₂)_n-, um aminoácido, uma unidade de peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

R₉ é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol -(OCH₂CH₂)_n-;

A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅)- e -CRR'N(R₅)-,

R₅ para cada ocorrência é independentemente -H ou uma

alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono;

D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietileno glicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$;

L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, e é uma unidade de polietileno glicol $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ -, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída; e

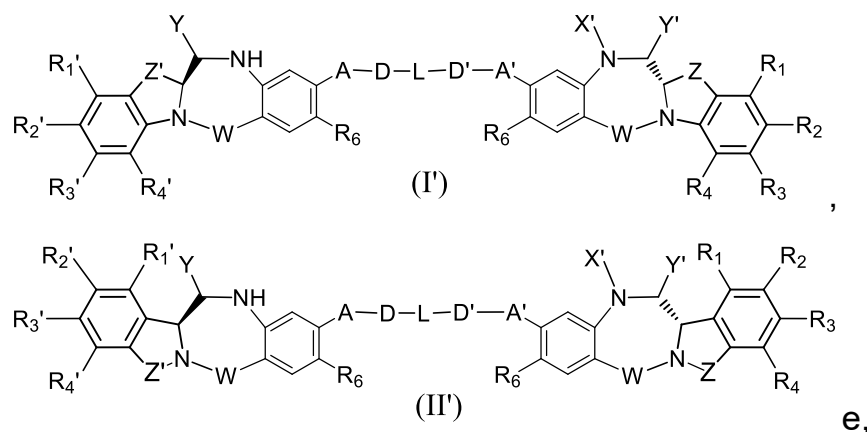
o reagente reativo à imina é selecionado do grupo que consiste em um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion) e um ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion).

3. Método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação a célula (CBA) conjugado a um composto citotóxico com um grupo ligante, caracterizado pelo fato de que compreende:

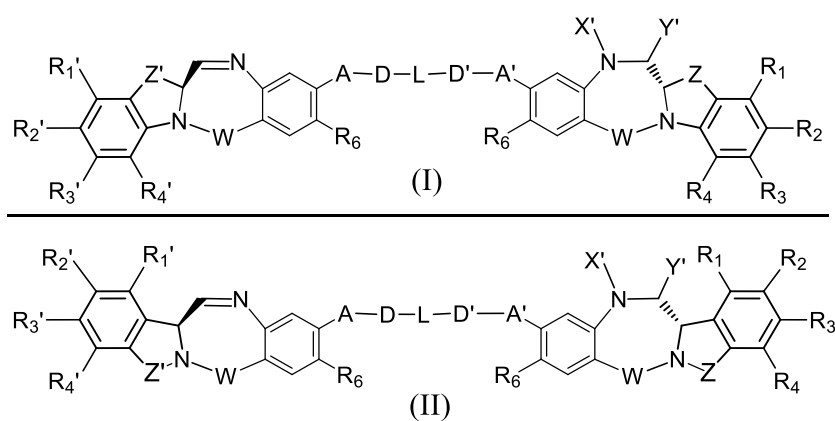
(a) reagir um composto citotóxico modificado com um agente de reticulação bifuncional compreendendo o grupo de ligação, um grupo reativo com o CBA (tal como um grupo tiol, um grupo maleimida, um grupo haloacetamida, ou um grupo amina), e um grupo reativo como o composto citotóxico modificado, para formar um segundo composto

citotóxico modificado covalentemente ligado a um resíduo do agente de reticulação bifuncional, em que o resíduo compreende o grupo de ligação e o grupo reativo com o CBA;

em que o composto citotóxico modificado é representado por uma das seguintes fórmulas, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:



em que o composto citotóxico modificado é produzido pela reação de um composto citotóxico contendo imina com um reagente reativo à imina, em que o composto citotóxico contendo imina é representado por uma das seguintes fórmulas ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo



em que:

o grupo $-C(Y)-N(H)-$ nas fórmulas (I') e (II') resulta da reação do reagente reativo à imina com o composto citotóxico contendo imina;

X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, uma

alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos;

R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída tendo 1 a 4 átomos de carbono;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, para cada ocorrência, é independentemente selecionado

do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

R' e R" são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

n é um inteiro de 1 a 24;

W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

R₆ é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R", -NO₂, ou, halogênio;

Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ -, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ - e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ -;

n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

R₇ e R₈ são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n$ -, um aminoácido, uma unidade de peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), $-CRR'O-$, $-CRR'-$, -S-, $-CRR'S-$, $-N(R_5)-$ e $-CRR'N(R_5)-$,

R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono;

D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

L é ausente, ou quando presente, compreende o grupo tiol, ou é uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, uma alquila ou alquenila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que a alquila, alquenila, fenila, ou anel heterocíclico ou heteroarila é opcionalmente substituída;

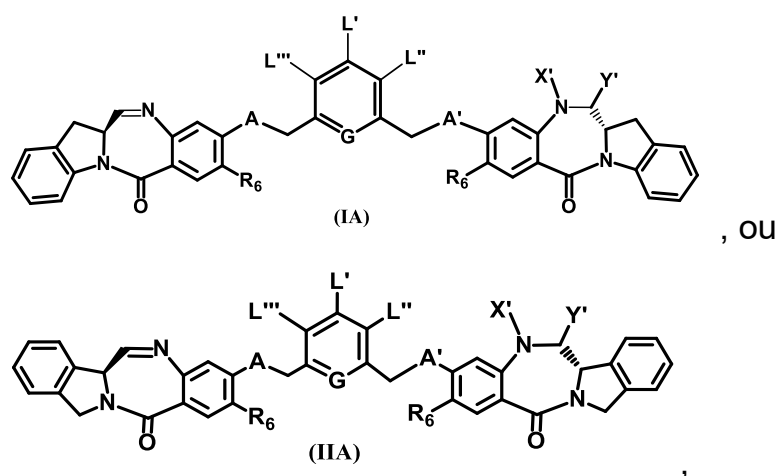
e o reagente reativo à imina é selecionado do grupo que consiste em um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^{2-} formado com um cátion), metabissulfito ($H_2S_2O_5$ ou um sal de $S_2O_5^{2-}$ formado com um cátion) e um ditionito ($H_2S_2O_4$ ou um sal de $S_2O_4^{2-}$ formado com um cátion); e

(b) reagir o segundo composto citotóxico modificado com o CBA através do grupo reativo com o CBA, em um pH de 4 a 9, para

formar o conjugado.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o composto citotóxico modificado compreende um grupo tiol, e o grupo reativo com o composto citotóxico modificado é um grupo reativo ao tiol.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o composto citotóxico contendo imina é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

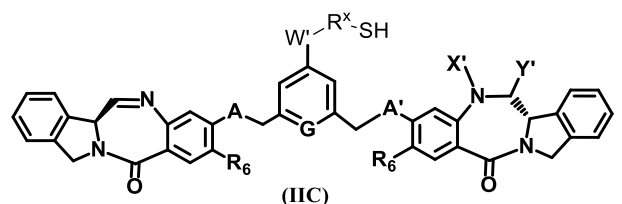
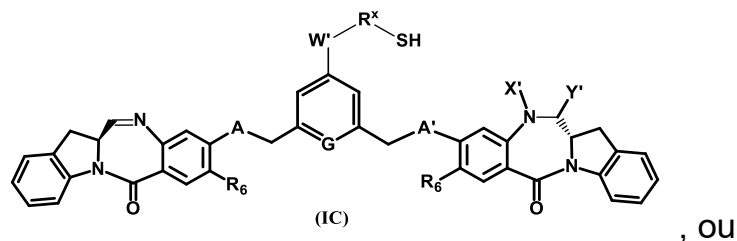
L' , L'' , e L''' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol - $(OCH_2CH_2)_n-R^C$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃M, um sulfato -OSO₃M, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

M é -H ou um cátion farmaceuticamente aceitável; e,

G é selecionado de -CH- ou -N-.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o composto citotóxico contendo imina é representado

por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

W' é ausente, ou quando presente, é selecionado de - $CR^eR^{e'}$ -, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS-, ou -C(=O)-, ou um aminoácido, ou um peptídeo tendo 2 a 8 aminoácidos;

R^X é ausente, ou quando presente é uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono, uma arila carregando 6 a 10 átomos de carbono ou um anel heterocíclico de 3 a 8 membros tendo 1 a 3 heteroátomos selecionado de O, N ou S;

R^e e $R^{e'}$ são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente carregando um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR¹⁰¹) ou amino terciário (-NR¹⁰¹R¹⁰²) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, tal como piperidina ou morfolina, em que R¹⁰¹ e R¹⁰² são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos

de carbono; preferencialmente, R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila linear ou ramificada tendo 1 a 6 átomos de carbono;

n é um inteiro de 1 a 24.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que:

X' é selecionado do grupo que consiste em -H, -OH, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina;

Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

A e A' são selecionados de -O- e -S-;

W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O) R^e)-, -S- ou -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono;

R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O) _{n} - R^k , em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente carregando um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR¹⁰¹) ou amino terciário (-NR¹⁰¹R¹⁰²) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros contendo nitrogênio, tal como piperidina ou morfolina, em que R^{101} e R^{102} são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono;

G é selecionado de -CH- ou -N-.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o agente de reticulação bifuncional

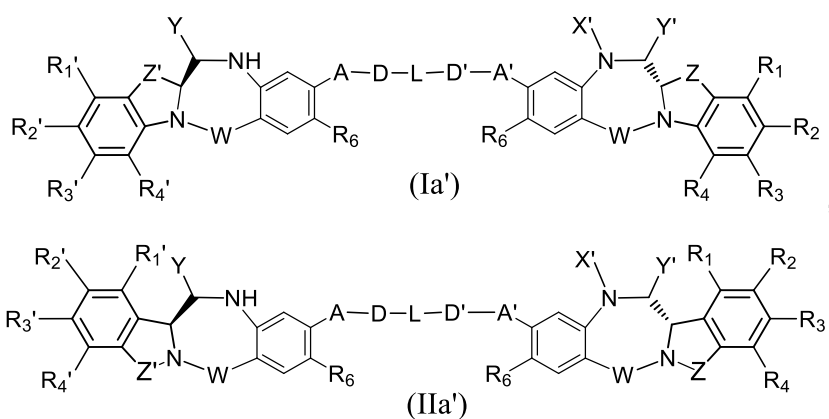
é selecionado de: N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carbóxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), N-succinimidil éster do ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), N-succinimidil éster do ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), N-hidroxisuccinimida éster do ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster (MBS), N-(α -maleimidoacetóxi)-succinimida éster (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, N-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), Iodoacetato de N-succinimidila (SIA), Bromoacetato de N-succinimidila (SBA), e N-succinimidil-3-(bromoacetamido)propionato (SBAP), bis-maleimidopolietilenoglicol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(β -maleimidopropilóxi)succinimida éster (BMPS), ácido 5-maleimidovalérico NHS, HBVS, ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico hidrazida•HCl (MPBH), Succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-iodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida éster (sulfo-MBS), N-(γ -maleimidobutirilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-GMBS), N-(ϵ -maleimidocaproilóxi)sulfosuccimido éster (sulfo-EMCS), N-(κ -maleimidoundecanoilóxi)sulfosuccinimida éster (sulfo-KMUS), sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB), CX1-1, sulfo-Mal PEG_n-Mal, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato

(SPDB), e *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio) 2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB).

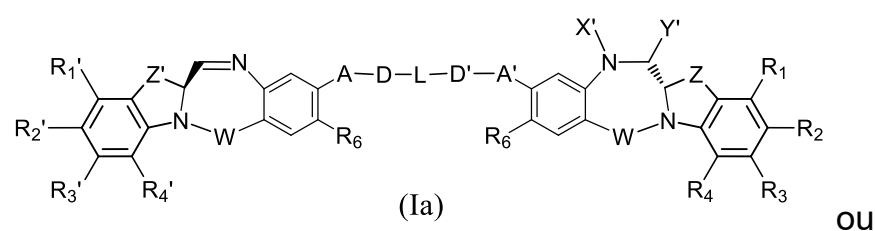
9. Método para preparar um conjugado compreendendo um de agente de ligação a célula (CBA) conjugado a um composto citotóxico com um grupo ligante, caracterizado pelo fato de que compreende reagir um segundo composto citotóxico modificado com o CBA em um pH de 4 a 9, em que o segundo composto citotóxico modificado compreende:

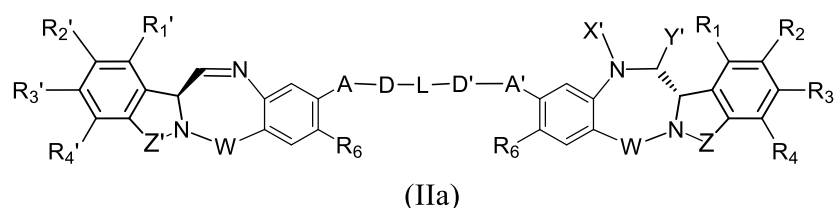
um resíduo de um agente de reticulação bifuncional ligado ao composto citotóxico, e o resíduo compreende o grupo de ligação e um grupo reativo selecionado de um éster reativo e um grupo reativo tiol, e,

é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que o segundo composto citotóxico modificado é produzido pela reação de um reagente reativo à imina com um composto citotóxico contendo imina que suporta o grupo de ligação e o grupo reativo e em que o composto citotóxico contendo imina é representado por uma das seguintes fórmulas:





ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,
em que:

o grupo -C(Y)-N(H)- nas fórmulas (Ia') e (IIa') resulta da reação do reagente reativo à imina com o composto citotóxico que contém imina;

X' é selecionado de -H, um grupo de proteção amina, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado ao mesmo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol - (CH₂CH₂O)_n-R^c, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

Y' é selecionado de -H, um grupo oxo, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado ao mesmo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma arila opcionalmente substituída de 6 a 18 membros, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos;

R^c é -H ou uma alquila linear ou ramificada; substituída ou não substituída tendo 1 a 4 átomos de carbono, ou o grupo de ligação

com o grupo reativo ligado ao mesmo;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' e R_4' são cada um independentemente selecionados do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogênio, guanidínio $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, um sulfóxido representado por -SOR', uma sulfona representada por -SO₂R', um sulfonato -SO₃⁻M⁺, um sulfato -OSO₃⁻M⁺, uma sulfonamida representada por -SO₂NR'R'', ciano, um azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'', e o grupo de ligação com o grupo reativo ligado ao mesmo;

R, para cada ocorrência, é independentemente selecionado do grupo que consiste em -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, uma arila opcionalmente substituída tendo 6 a 18 átomos de carbono, um anel heteroarila opcionalmente substituída de 5 a 18 membros contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, ou um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros contendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

R' e R'' são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, e um anel heterocíclico opcionalmente substituído de 3 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P;

n é um inteiro de 1 a 24;

W é selecionado de C=O, C=S, CH₂, BH, SO e SO₂;

R_6 é -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halogênio ou o grupo de ligação com o grupo reativo ligado ao mesmo;

Z e Z' são independentemente selecionados de $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ e $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$;

n' e na' são os mesmos ou diferentes, e são selecionados de 0, 1, 2 e 3;

R_7 e R_8 são os mesmos ou diferentes, e são cada um independentemente selecionados de -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, um aminoácido, uma unidade de peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

R_9 é independentemente selecionado de -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

A e A' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente selecionados de -O-, oxo ($-C(=O)-$), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ e -CRR'N(R₅)-;

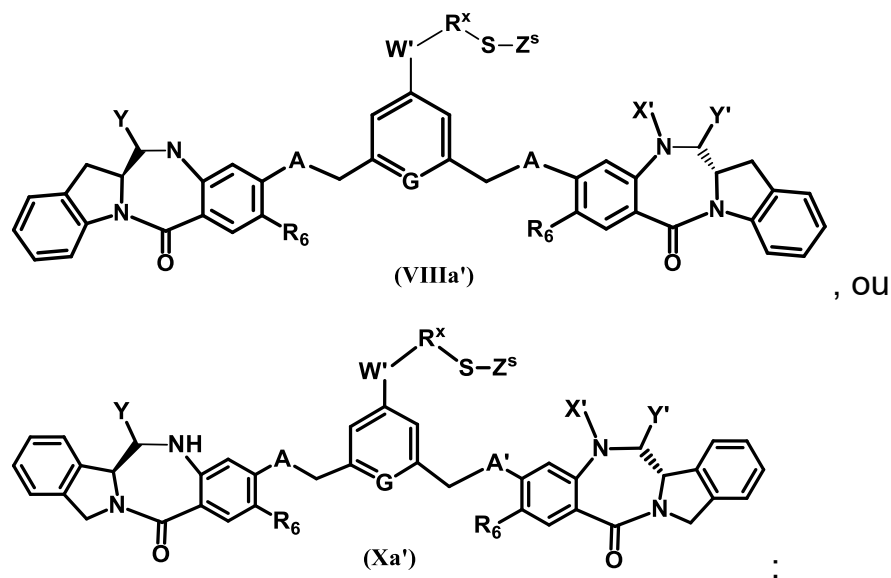
R_5 para cada ocorrência é independentemente -H ou uma alquila linear ou ramificada opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono;

D e D' são os mesmos ou diferentes, e são independentemente ausentes ou selecionados do grupo que consiste em uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica opcionalmente substituída tendo 1 a 10 átomos de carbono, um aminoácido, um peptídeo carregando 2 a 6 aminoácidos, e uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$;

L é ausente, o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este, uma unidade de polietileno glicol $-(OCH_2CH_2)_n-$, uma alquila ou

alquenila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono, um grupo fenila, um anel heterocíclico de 3 a 18 membros ou um anel heteroarila de 5 a 18 membros tendo 1 a 6 heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e P, em que o alquila ou alquenila é opcionalmente substituída por o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; fenila ou anel heterocíclico ou heteroaril pode ser opcionalmente substituído, em que o substituinte pode ser o grupo de ligação com o grupo reativo ligado a este; e o reagente reativo à imina é selecionado do grupo que consiste em um sulfito (HSO_3 , HSO_2 ou um sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} ou HSO_2^- formado com um cátion), metabissulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formado com um cátion) e um ditionito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou um sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formado com um cátion).

10. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 9, caracterizado pelo fato de que o segundo composto citotóxico modificado é representado por qualquer uma das seguintes fórmulas:



em que:

Y é selecionado de $-\text{SO}_3\text{M}$, $-\text{SO}_2\text{M}$ ou $-\text{OSO}_3\text{M}$;

M é $-\text{H}$ ou um cátion farmacologicamente aceitável como Na^+ ou K^+ ;

X' é selecionado do grupo que consiste em $-\text{H}$, $-\text{OH}$, uma

alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono, fenila, e um grupo de proteção amina;

Y' é selecionado do grupo que consiste em -H, um grupo oxo, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica substituída ou não substituída tendo de 1 a 10 átomos de carbono;

A e A' são selecionados de -O- e -S-;

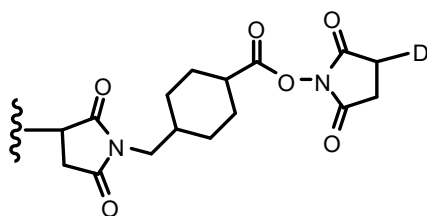
W' é ausente ou selecionado de -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- ou -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

R^x é ausente ou selecionado de uma alquila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono;

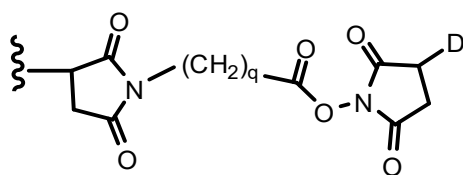
R^e é -H, uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono ou -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, em que R^k é um -H, uma alquila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 6 átomos de carbono, opcionalmente tendo um grupo amino secundário (por exemplo, -NHR¹⁰¹) ou amino terciário (-NR¹⁰¹R¹⁰²) ou um heterociclo de 5 ou 6 membros tendo nitrogênio, como piperidina ou morfolina, em que R¹⁰¹ e R¹⁰² são cada um independentemente uma alquila, alquenila ou alquinila linear, ramificada ou cíclica tendo 1 a 10 átomos de carbono;

G é selecionado de -CH- ou -N-;

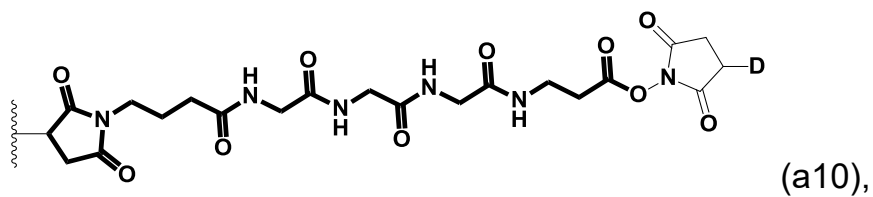
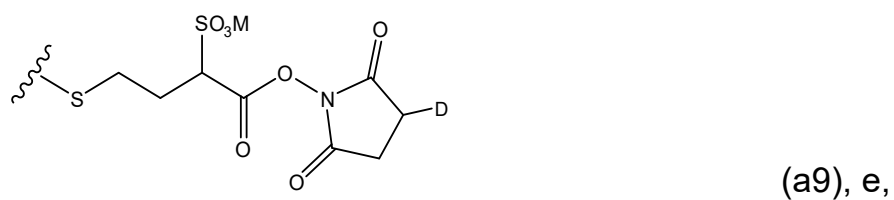
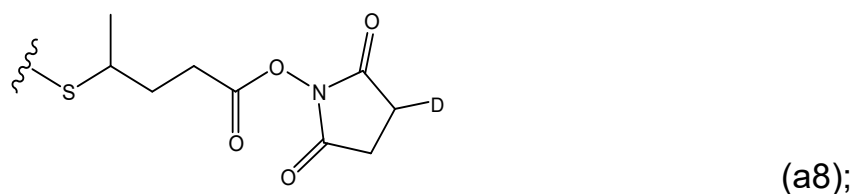
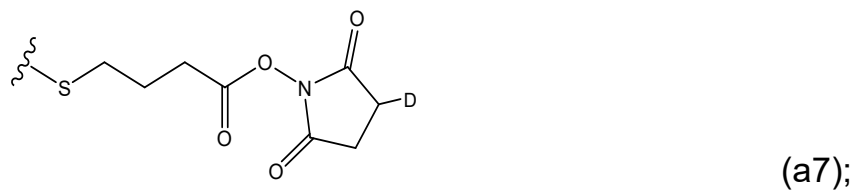
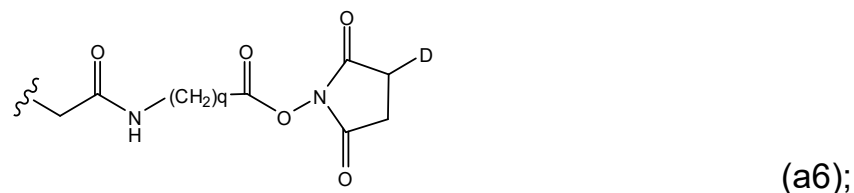
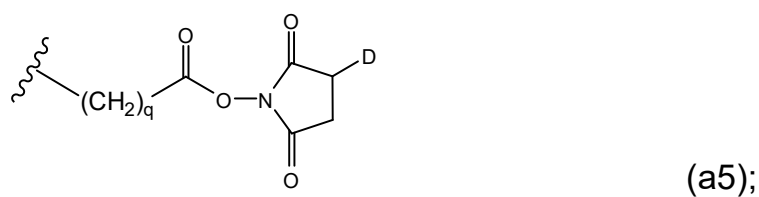
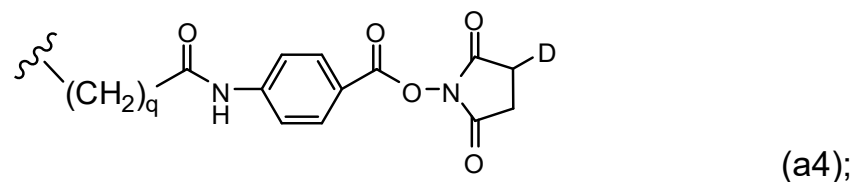
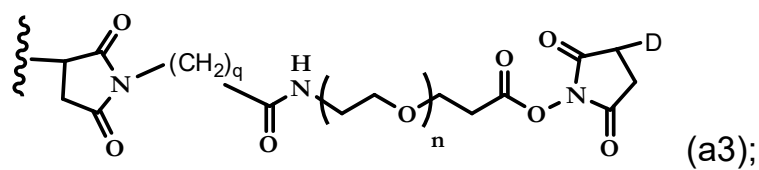
Z^s é -H, ou é selecionado de qualquer uma das seguintes fórmulas:



(a1);



(a2);



em que:

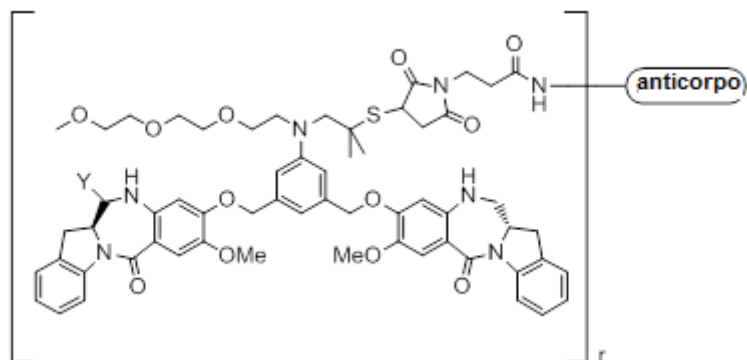
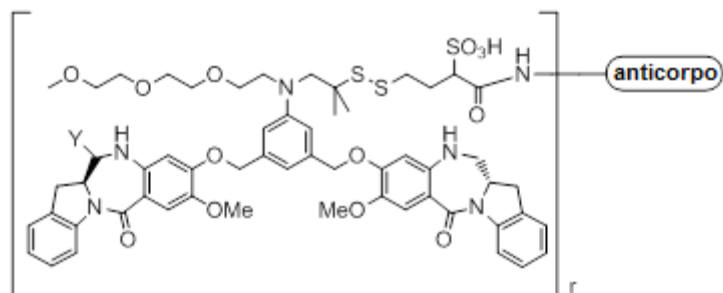
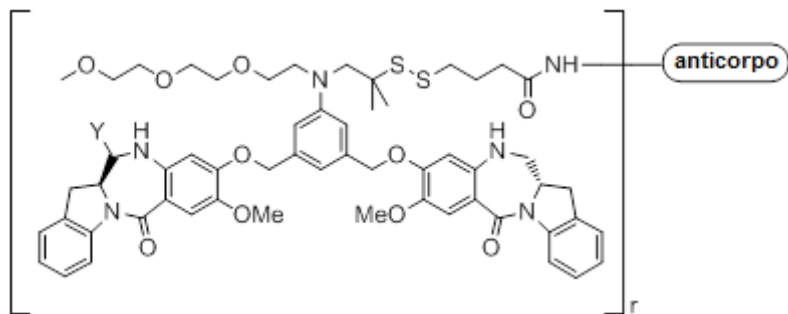
q é um inteiro de 1 a 5; preferencialmente q é 2;

n é um inteiro de 2 a 6; preferencialmente n é 4;

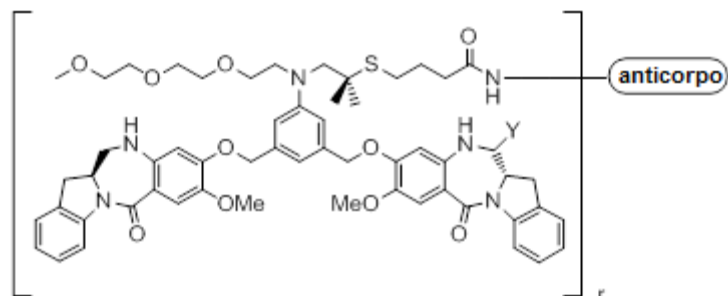
D é -H ou -SO₃M;

M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável, como Na⁺ ou K⁺.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o conjugado é:



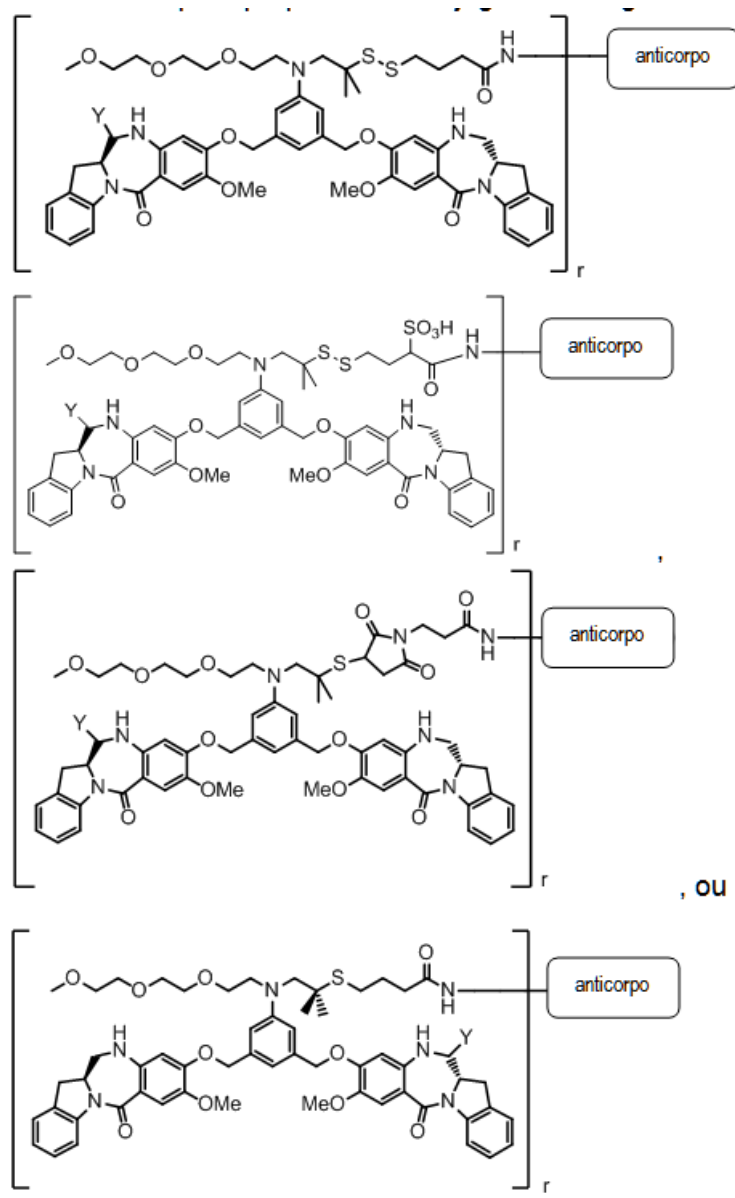
ou



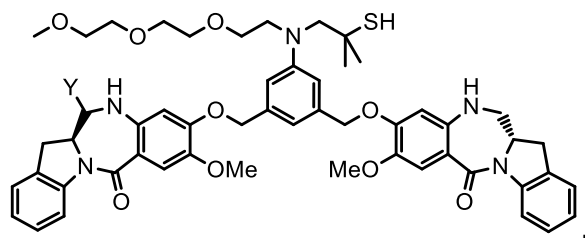
em que r é um inteiro de 1 a 10, Y é $-\text{SO}_3\text{M}$, e M é $-\text{H}$ ou um cátion farmaceuticamente aceitável.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação à célula é um anticorpo, um anticorpo de cadeia simples, um fragmento de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal de cadeia simples, ou um fragmento de anticorpo monoclonal que especificamente se liga a uma célula-alvo, um anticorpo quimérico, um fragmento de anticorpo quimérico que especificamente se liga à célula-alvo, um domínio de anticorpo, um fragmento de domínio de anticorpo que especificamente se liga à célula-alvo, uma linfocina, um hormônio, uma vitamina, um fator de crescimento, um fator estimulante de colônia, ou uma molécula de transporte de nutriente.

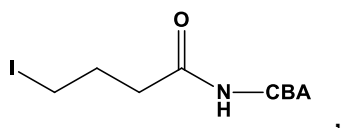
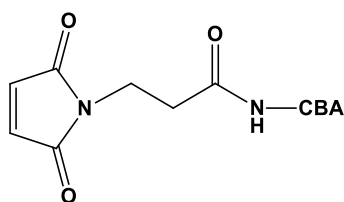
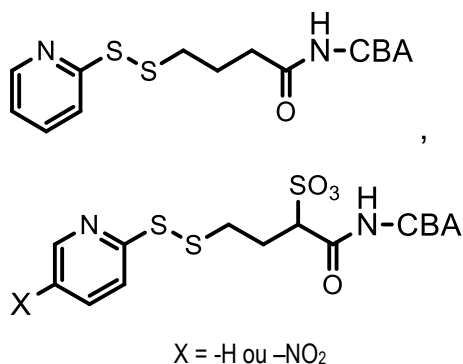
13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para preparar um conjugado da seguinte fórmula:



e compreende reagir um composto citotóxico modificado da seguinte fórmula:



com um CBA modificado da seguinte fórmula, respectivamente, em um pH de 4 a 9,

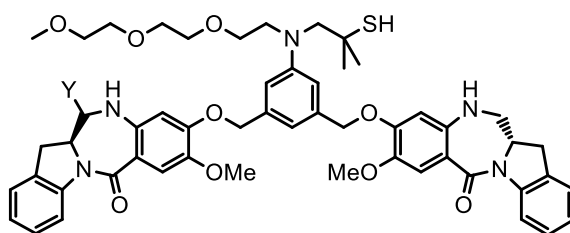


em que:

r é um inteiro de 1 a 10; e

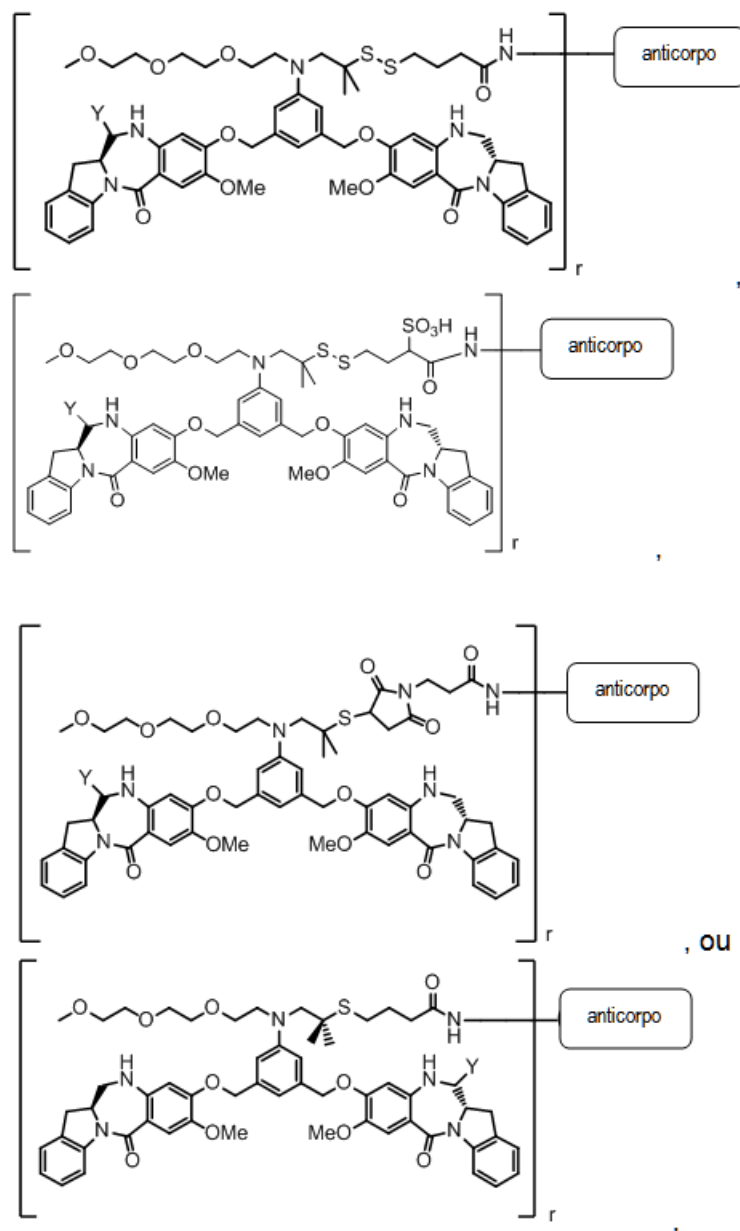
em que o grupo -C(Y)-N(H)- nos conjugados resulta da reação do reagente reativo à imina com o composto citotóxico contendo imina.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o composto citotóxico modificado é da seguinte fórmula:



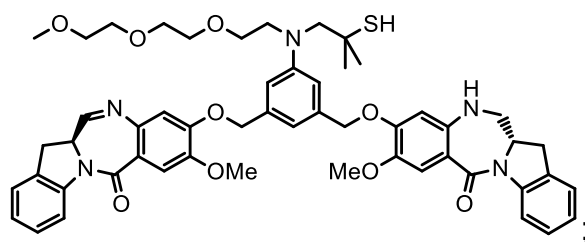
em que Y é -SO₃M e M é -H ou um cátion farmacologicamente aceitável.

15. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que é para preparar um conjugado da seguinte fórmula:

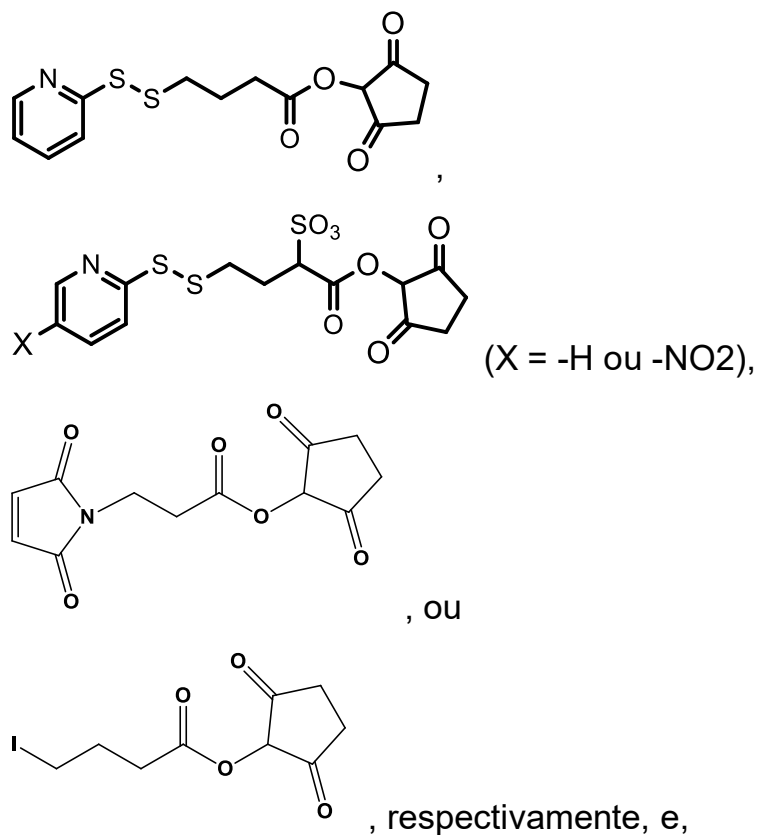


e compreende reagir o CBA com um composto citotóxico contendo imina, um reagente reativo de imina, e um agente de reticulação bifuncional compreendendo o grupo de ligação para formar o conjugado, em que:

o composto citotóxico contendo imina é:



o agente de reticulação bifuncional é:



em que o grupo -C(Y)-N(H)- nos conjugados resulta da reação do reagente reativo à imina com o composto citotóxico contendo imina.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o reagente reativo à imina é NaHSO₃ ou KHSO₃.

FIG. 1A

Espectro de massa de conjugados huMy9-6-2 desglicosilados preparados sem e com bissulfito, contendo 1,4 DAR (A) e 3,1 DAR (B), respectivamente.

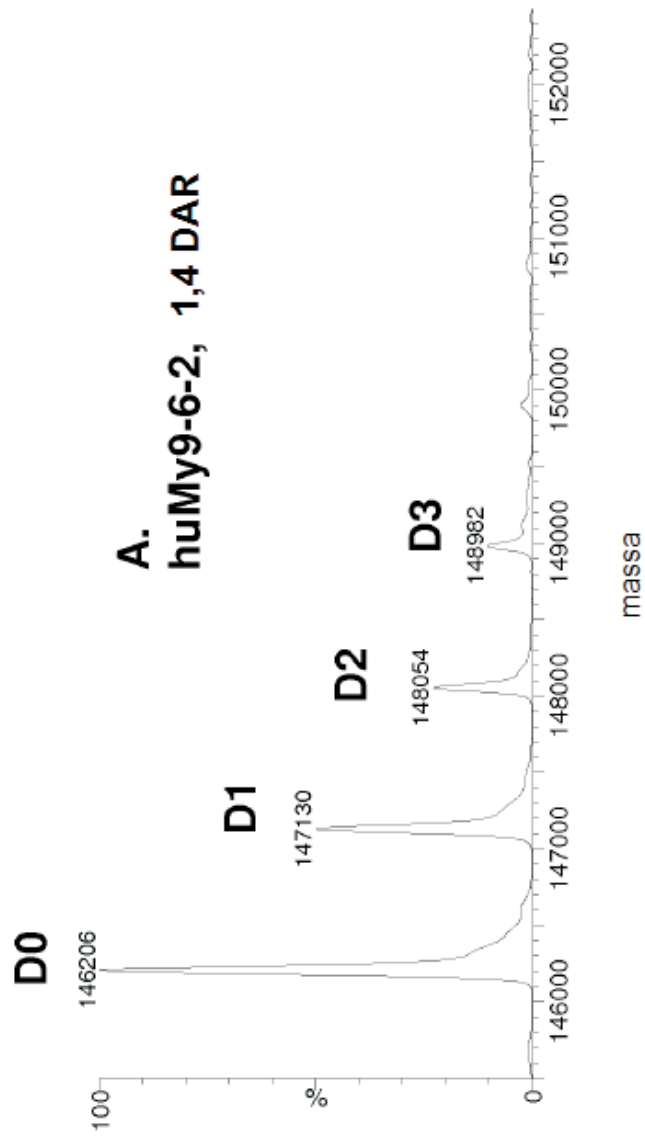


FIG. 1B

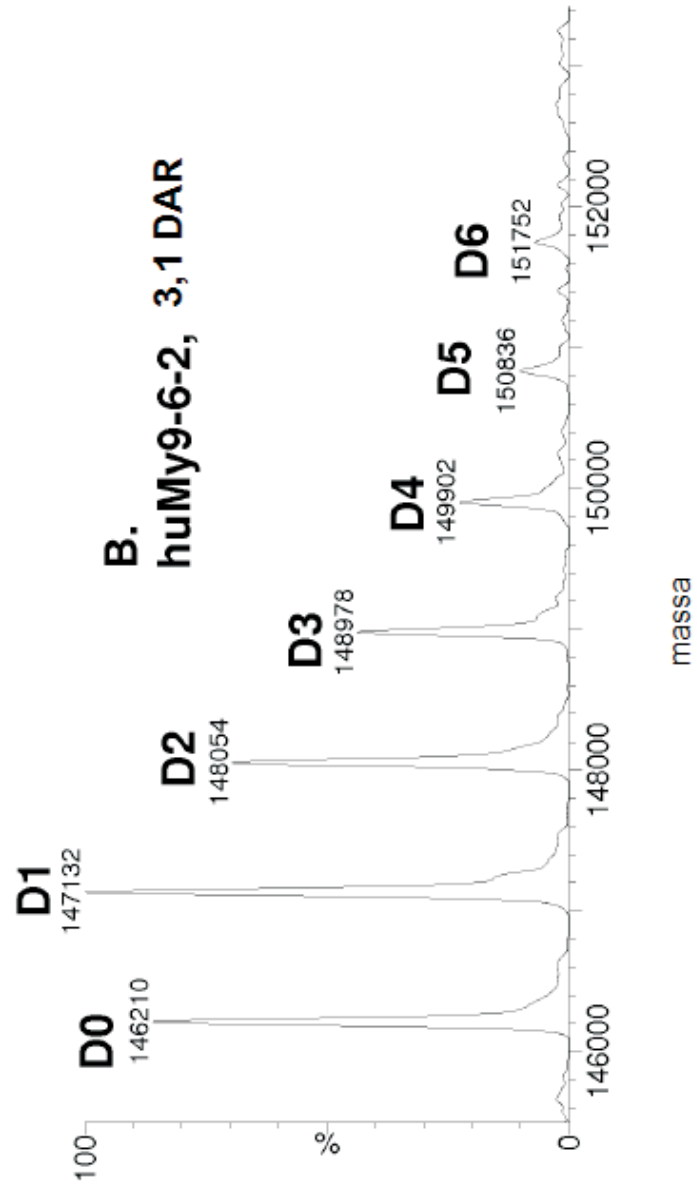


FIG. 2

Citotoxicidade semelhante *in vitro* de conjugados HuMy9-6-Droga 2 preparados sem e com bissulfito de sódio contra células HL60 que expressam antígeno CD33.

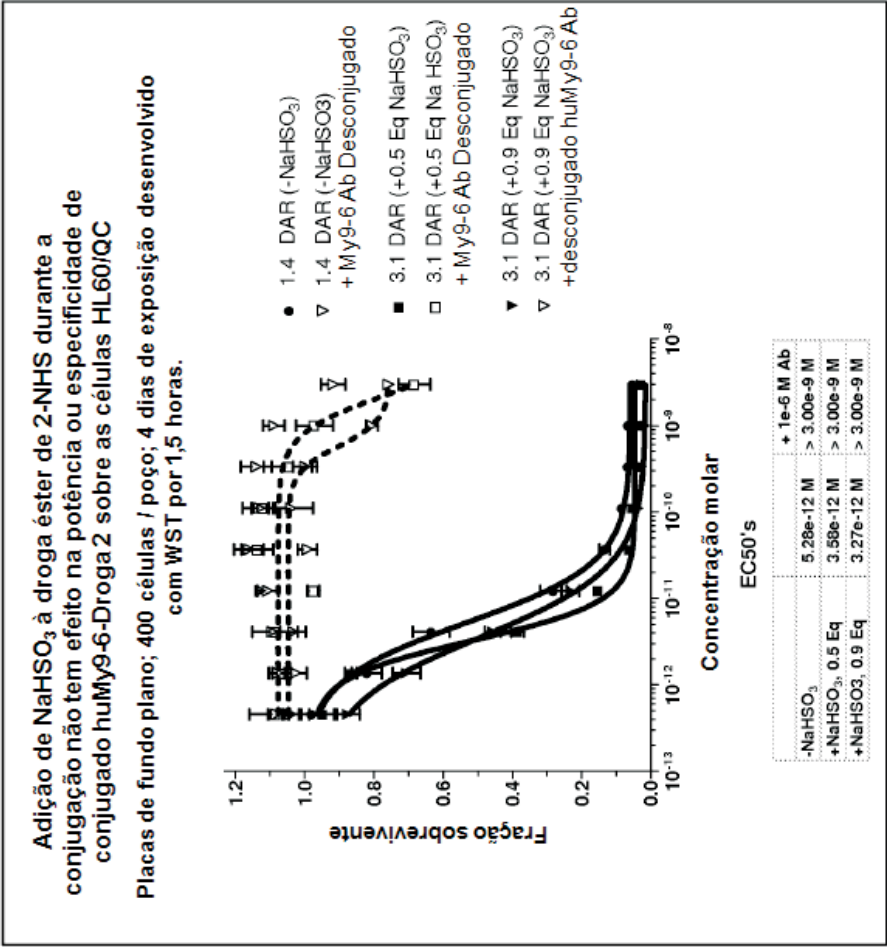


FIG. 3

Conjugados anti-CD22 Ab-Droga 2 preparados sem e com bissulfito de sódio mostram semelhança na citotoxicidade *in vitro* contra células BJAB que expressam antígeno CD22.

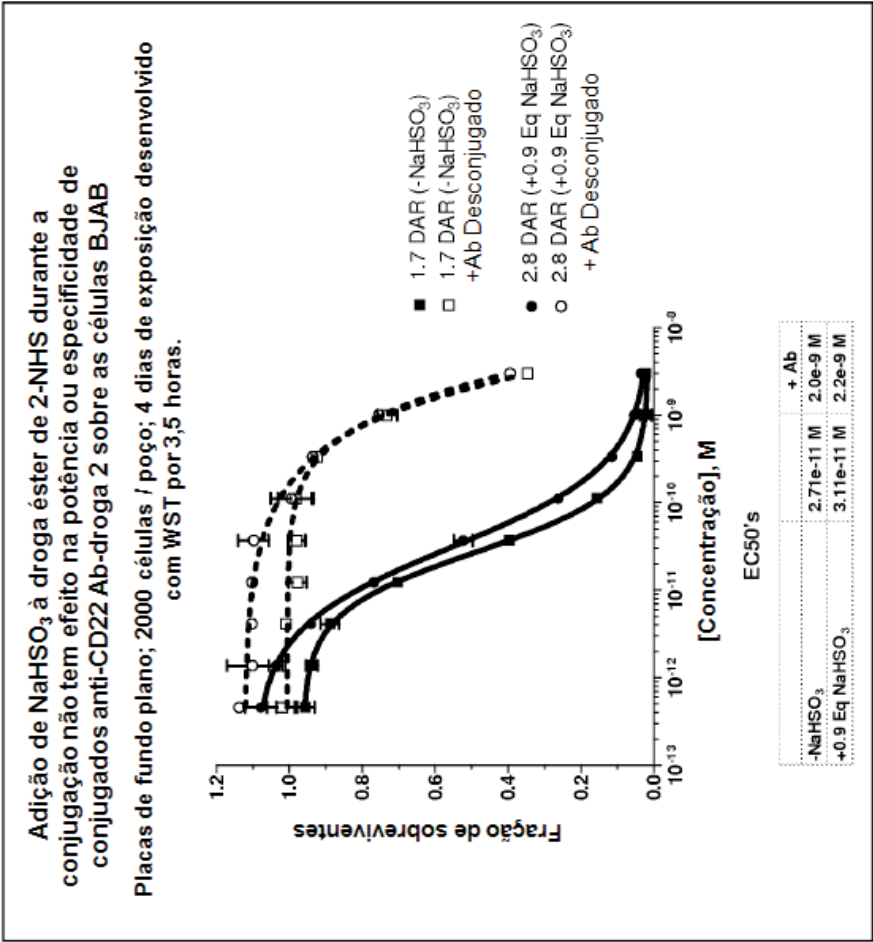


FIG. 4

Análise por HPLC de fase reversa de 2-NHS e de bissulfito de sódio tratado com 2-NHS

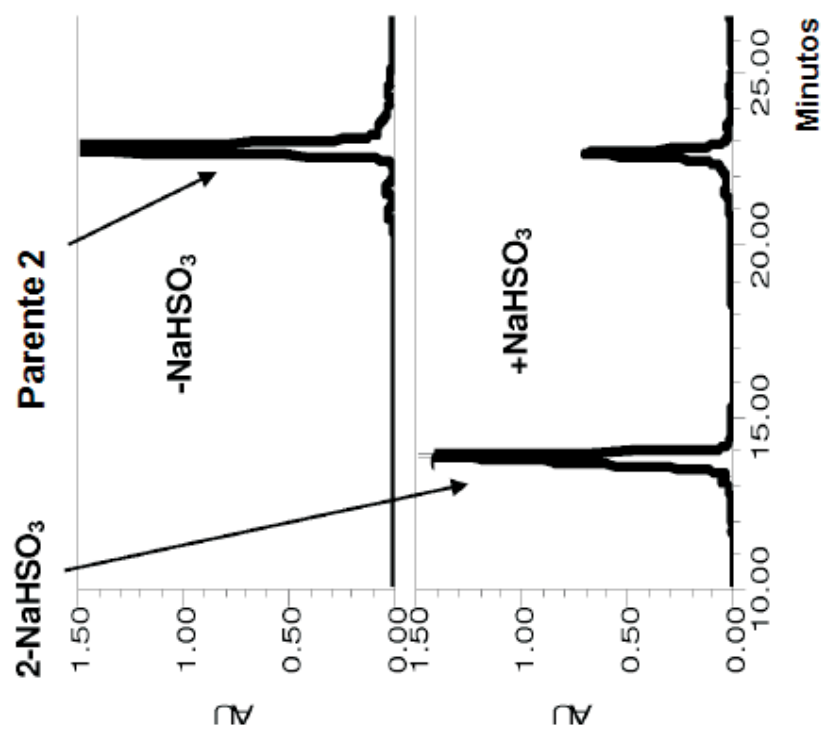


FIG. 5

Análise MS de huMy9-6-SPDB-droga **1** desglicosilado preparado como e sem bissulfito de sódio usando 7 equivalentes molares de **1-SPDB-NHS** por anticorpo. A) Conjugado preparado sem bissulfito de sódio com média 1,4 droga 1/Ab e espécie de anticorpo com até três moléculas de droga 1 ligadas. B) Conjugado preparado com bissulfito de sódio com média de 2,5 **1**/Ab e espécie de anticorpo com até sete moléculas da droga **1** ligadas.

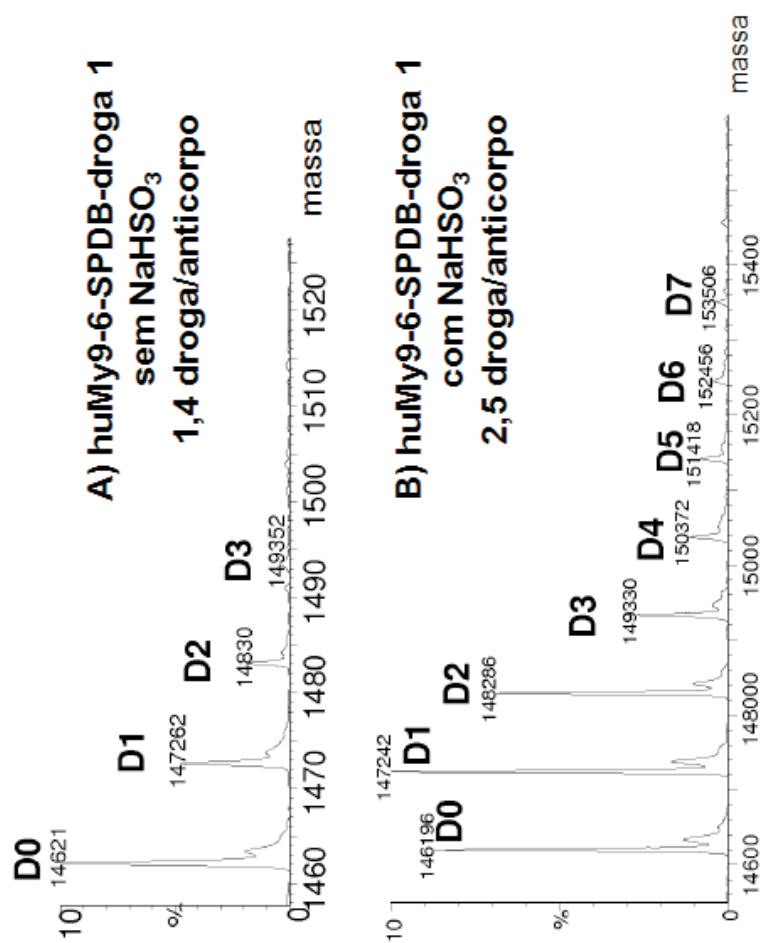


FIG. 6

Adição de reação de conjugação de bissulfito de sódio da droga 1-SPDB-NHS não resultou em fragmentação de anticorpo (SDS-PAGE não redutor; análise de chip gel).

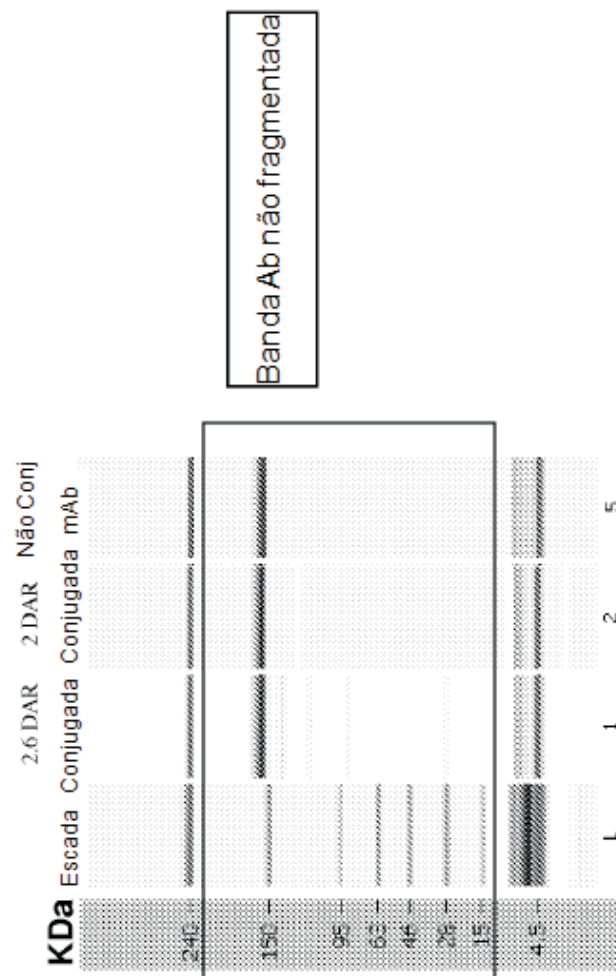


FIG. 7

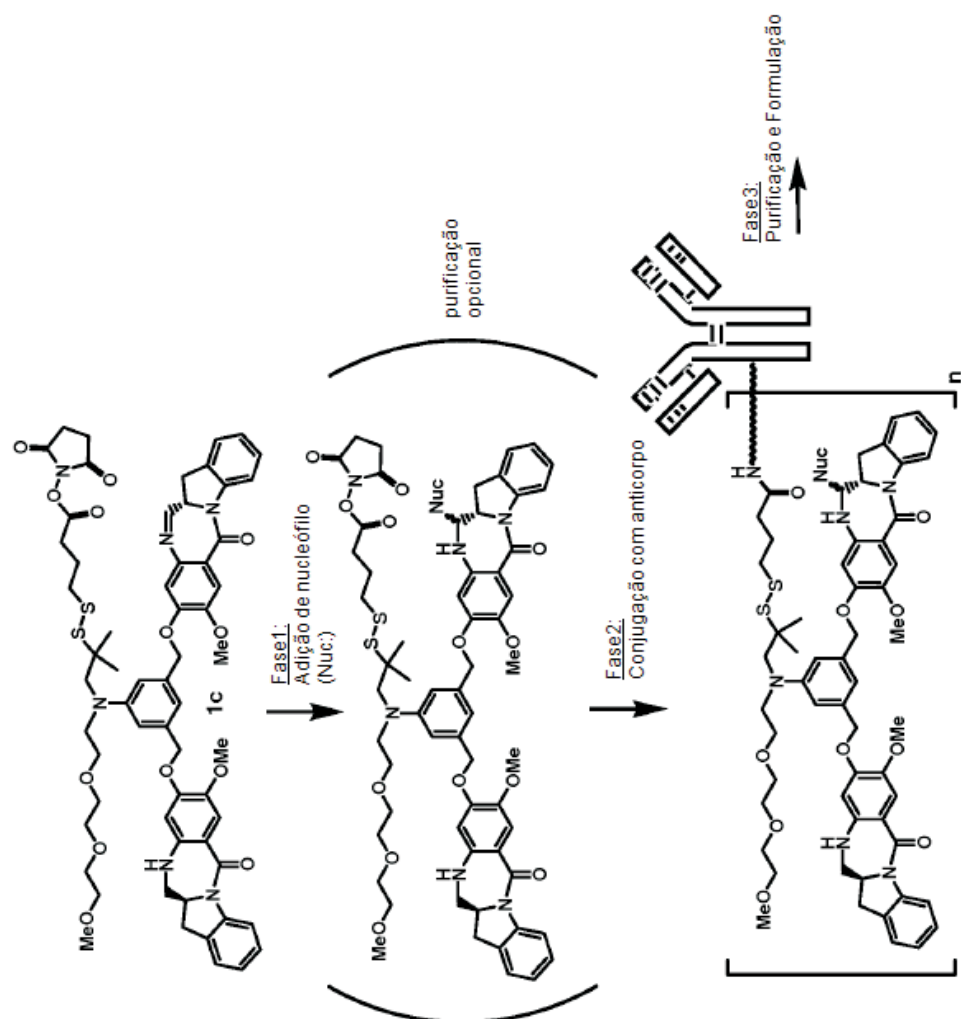


FIG. 8

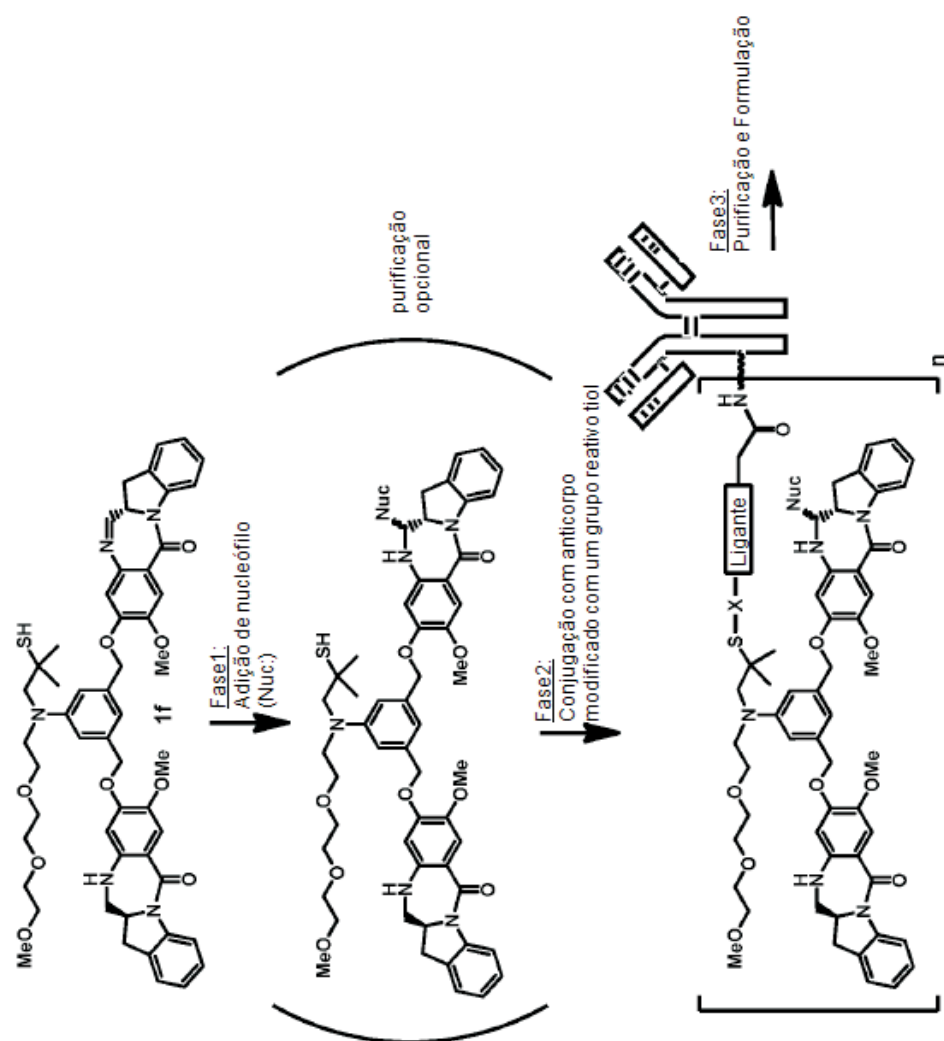


FIG. 9

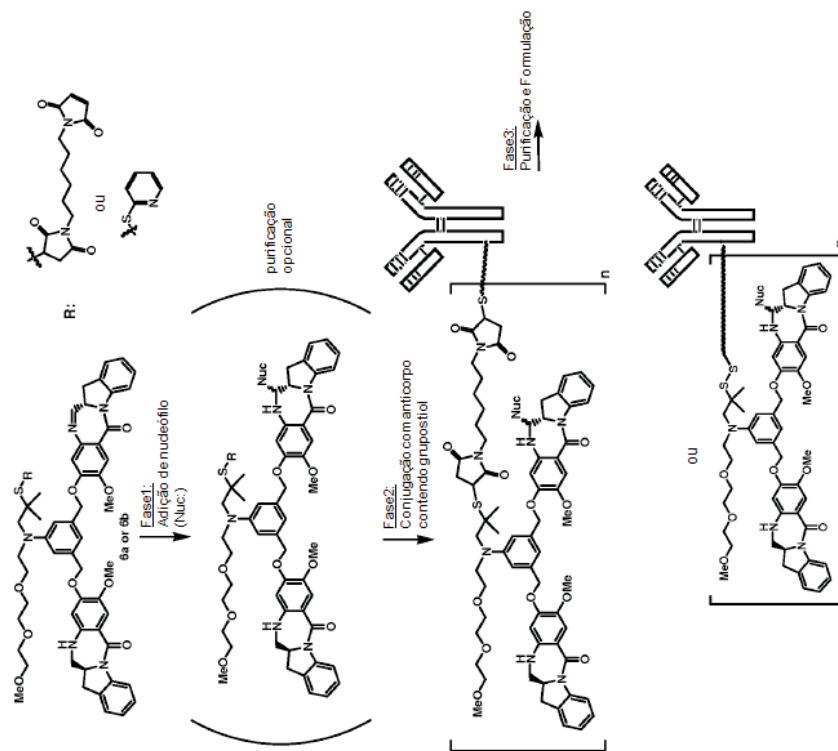


FIG. 10

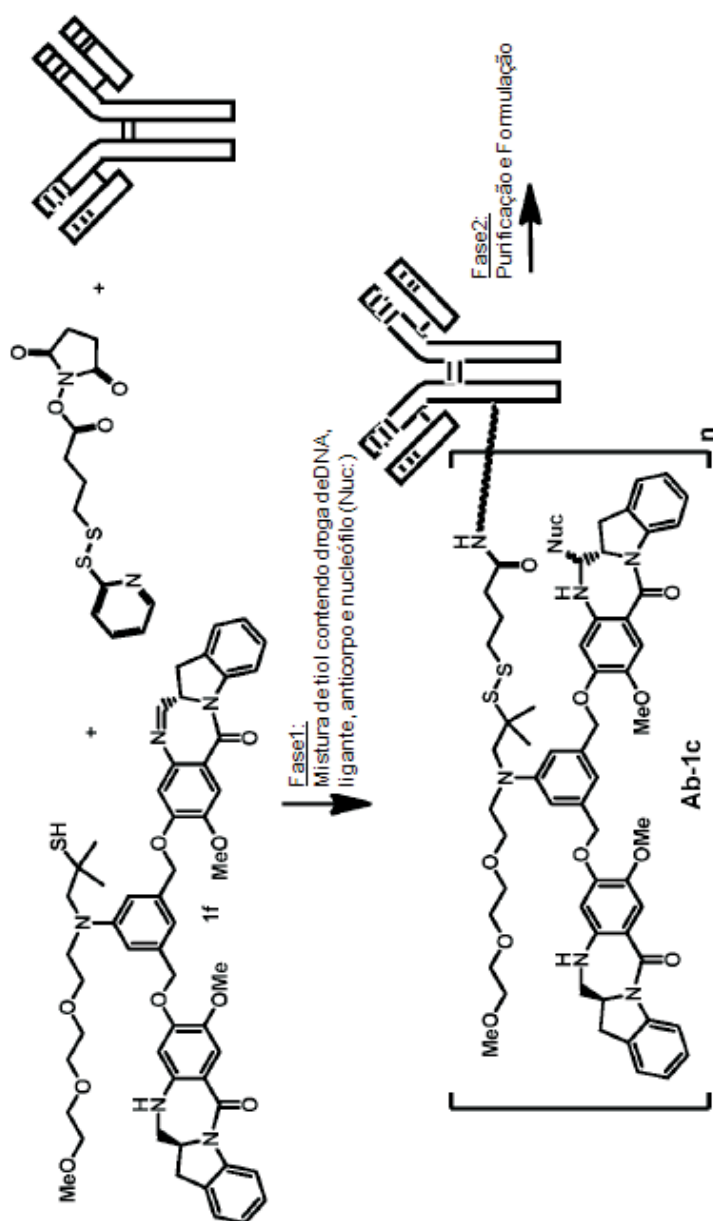


FIG. 11

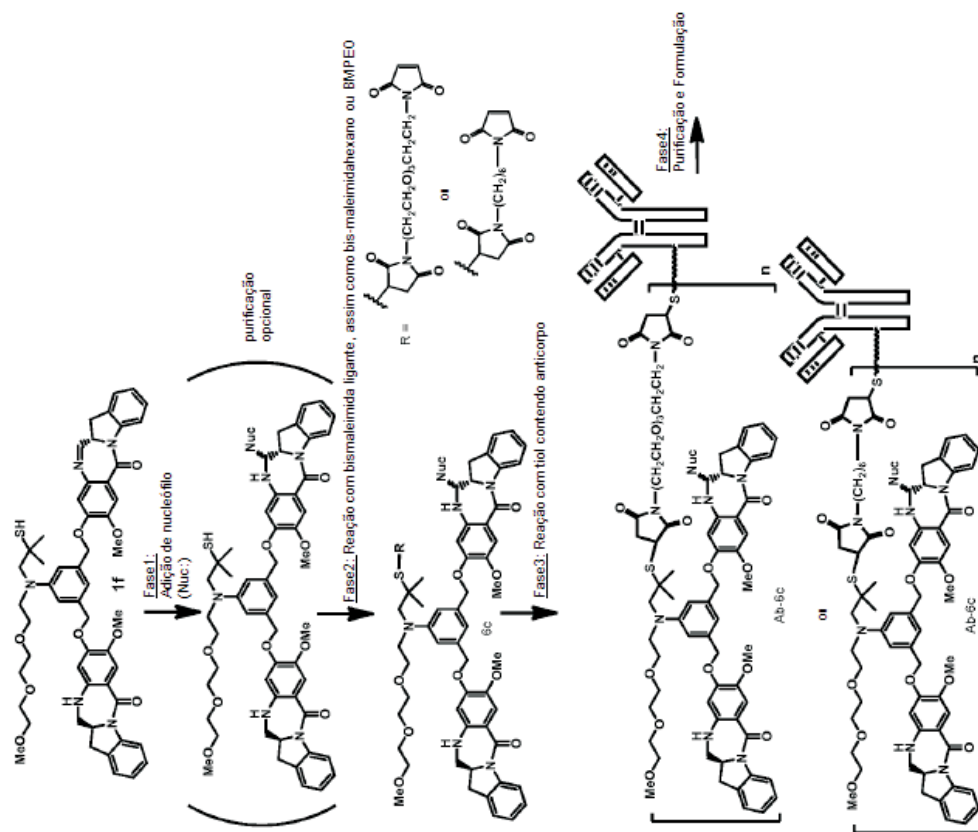


FIG. 12

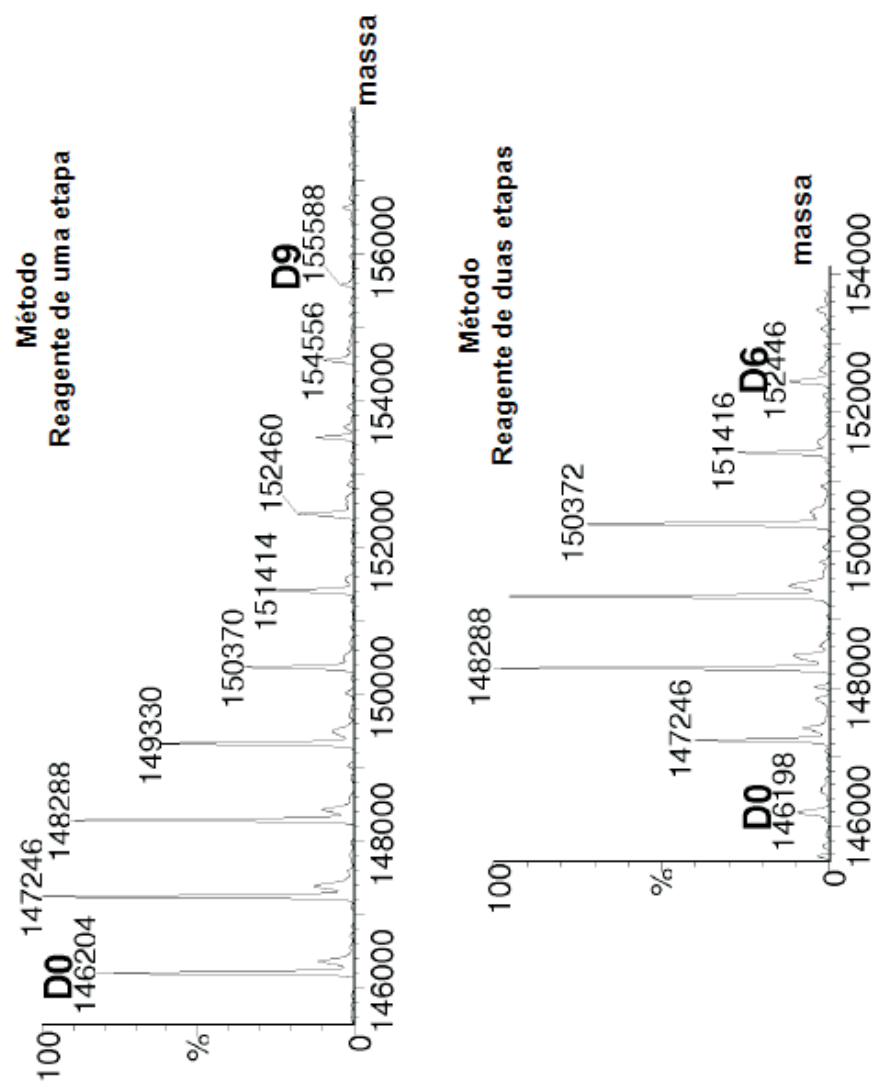


FIG. 13

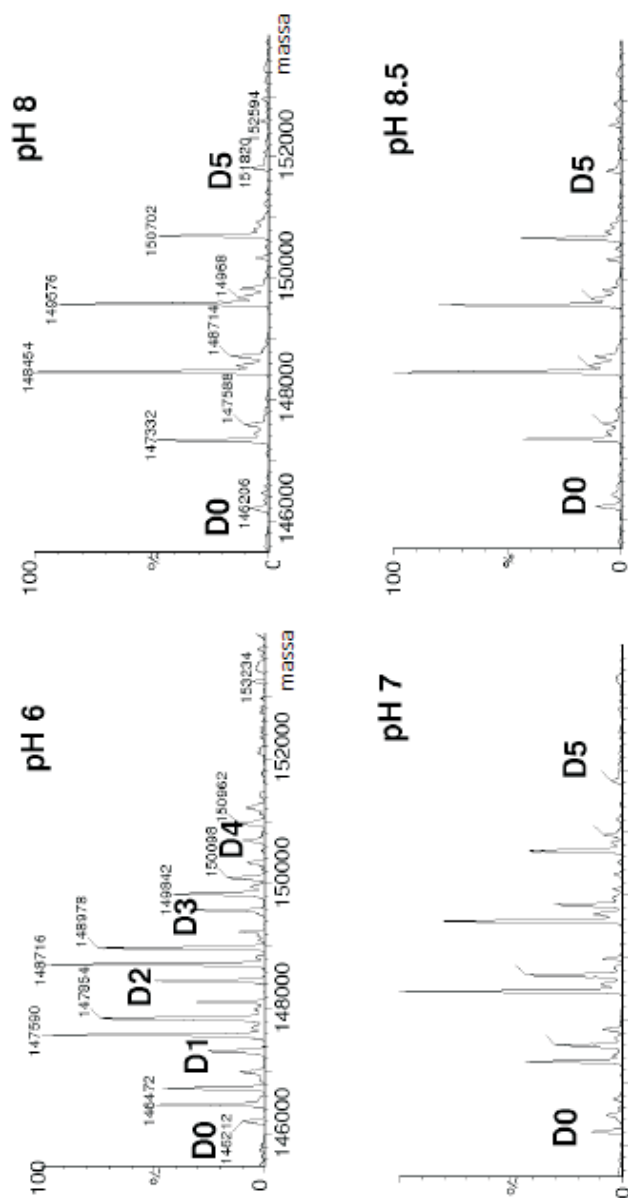


FIG. 14

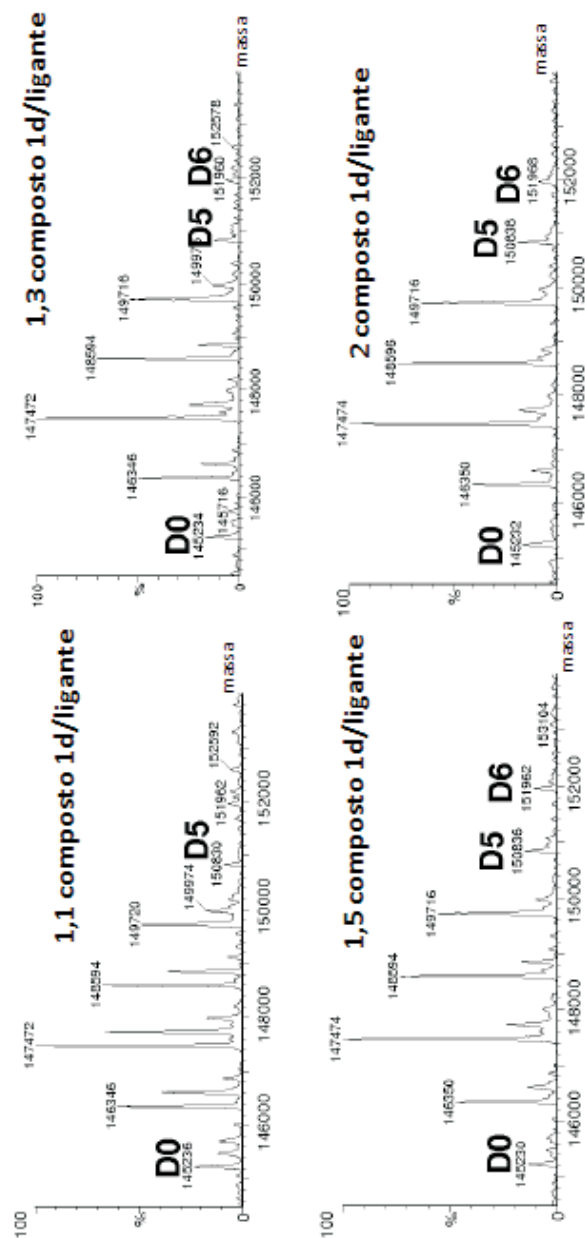


FIG. 15

Reagente	Ab-Droga (UV)	% Monômero (SEC)	% droga em monômero
Hidrossulfito de Sódio	2.6	88	82
Bissulfito de Sódio	2.6	88	83
Metabissulfito de Sódio	2.7	88	82
Nenhum aditivo	0.1	98	94

FIG. 16

Esquema de Conjugação de Duas Etapas

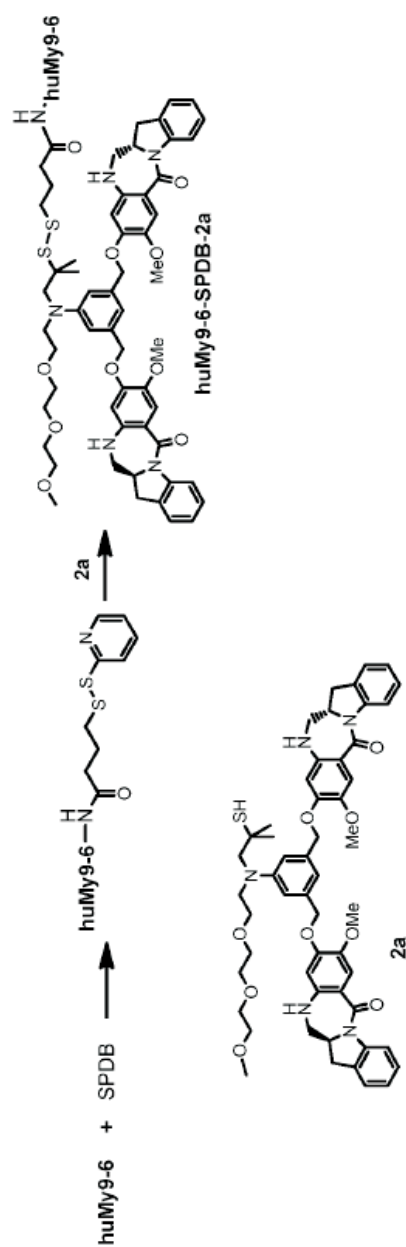
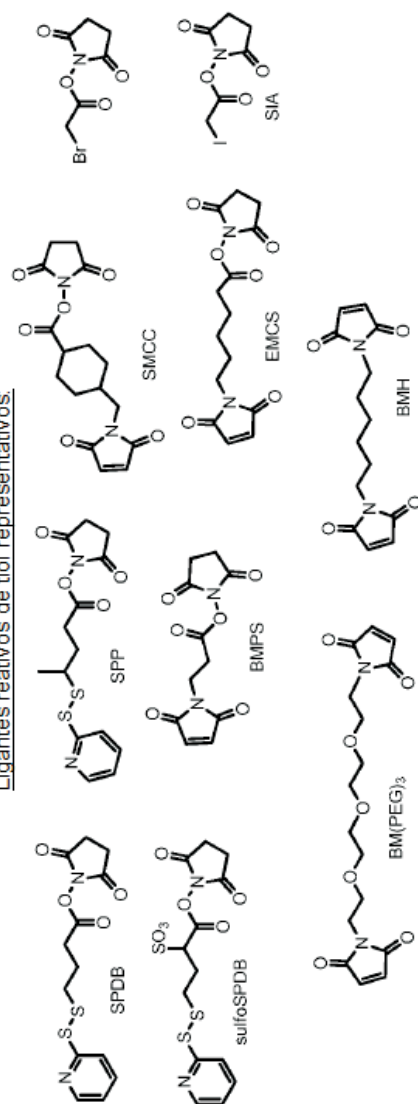
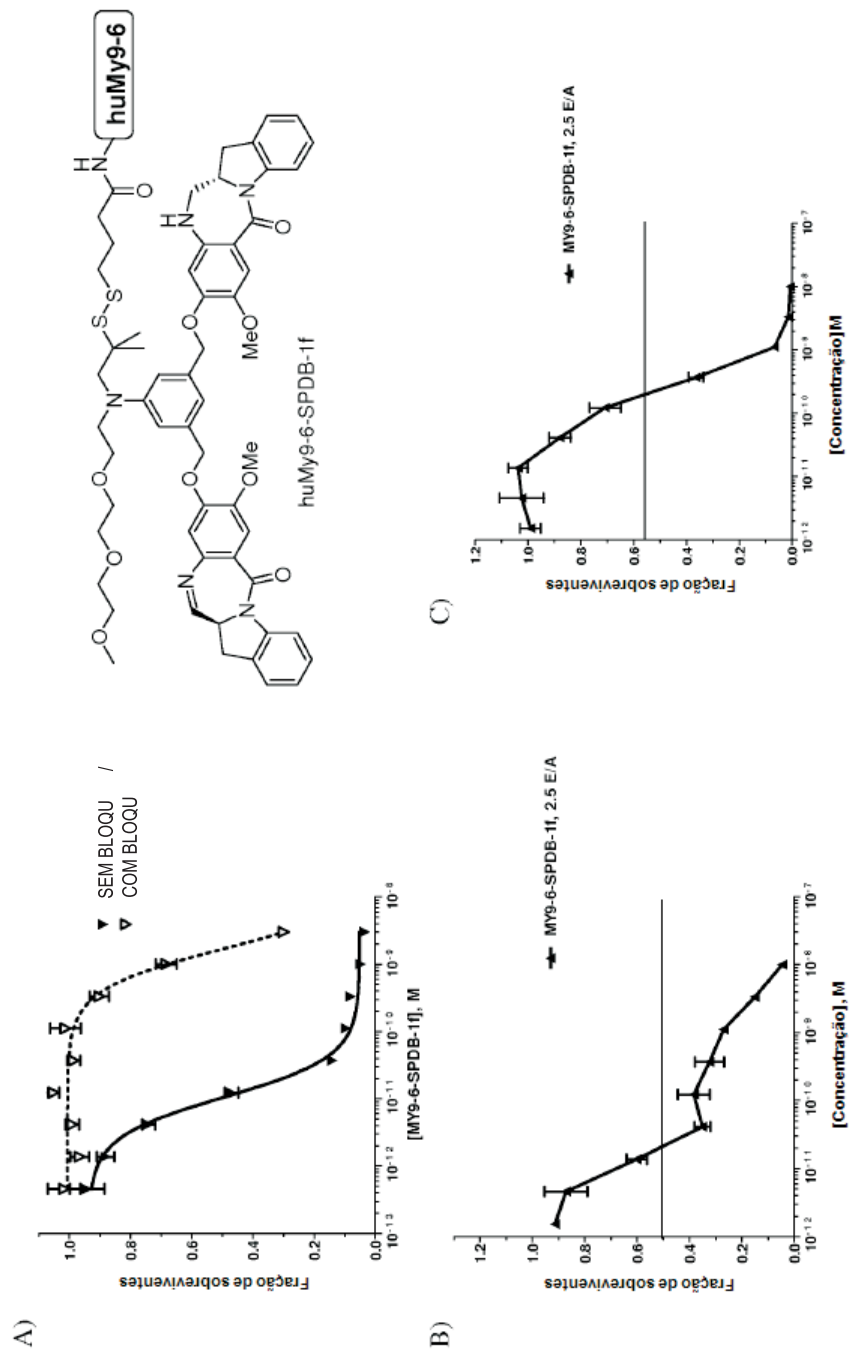
Ligantes reativos de tiol representativos:

FIG. 17

Atividade antiproliferativa de humMY9-6-SPDB-1f contra (A) HL60/QC (Ag⁺) células com e sem bloqueio dos locais de ligação de antígenos, (B) células HL60/ATCC (Ag⁺), e (C) células NB-4 (Ag⁺)



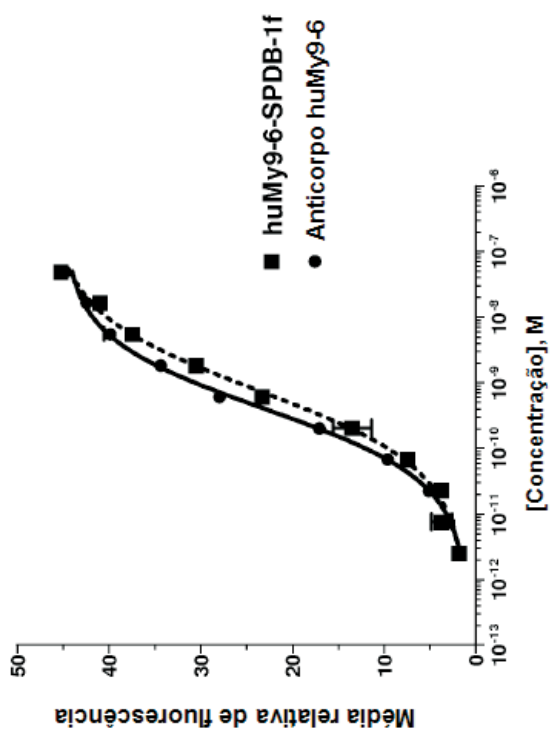
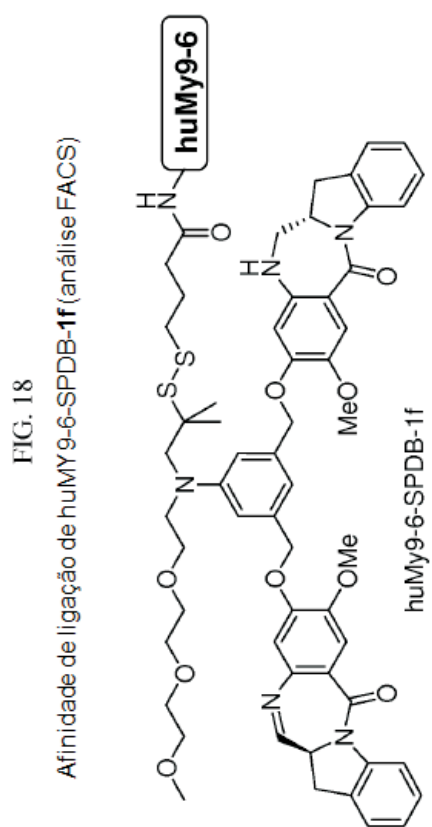


FIG. 19
Eficácia *in vivo* de huMY9-6-SPDB-1f em HL60/QC Camundongos Puros Contendo Tumor

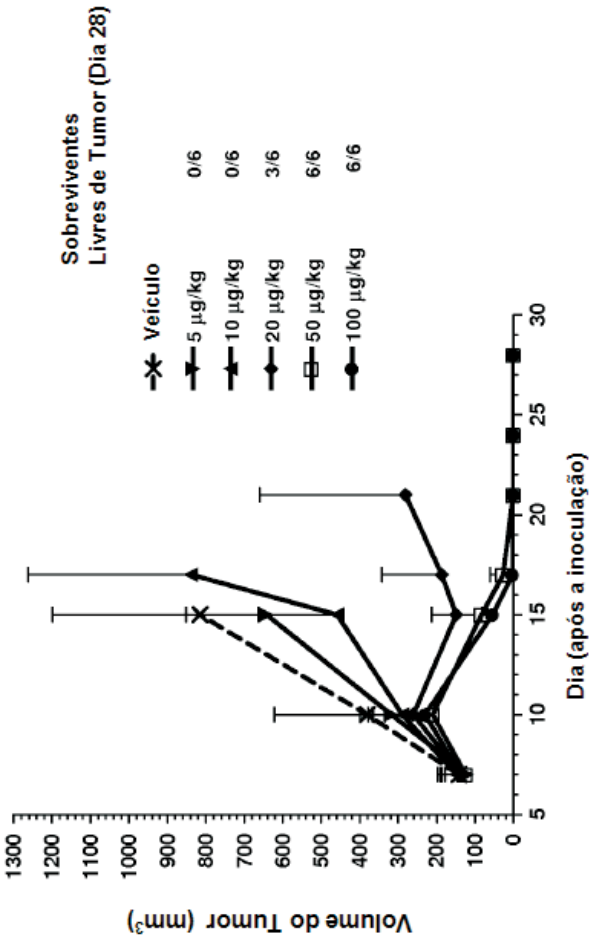
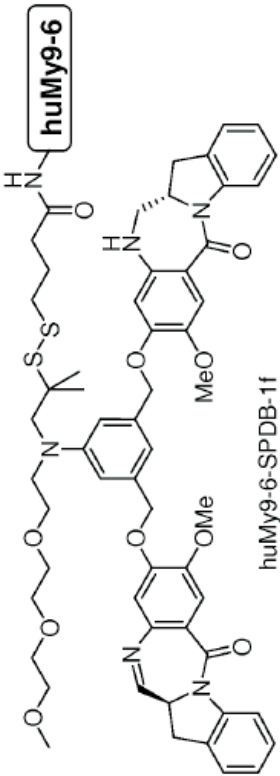
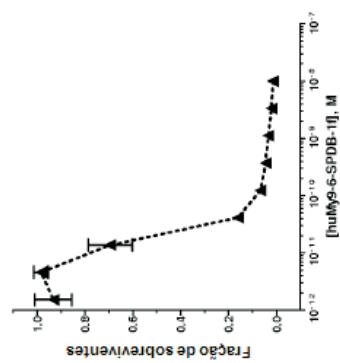


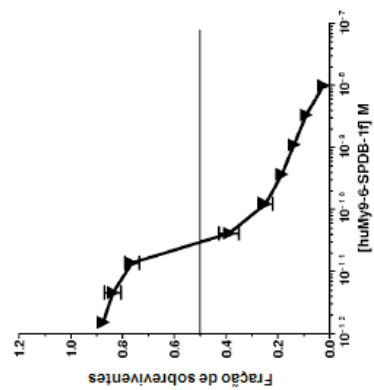
FIG. 20

Atividade antiproliferativa de humMY 9-6-SPDB-1f contra a Linhagem de Células Positivas para Antígeno (A) células HL60/QC, (B) células HL60/ATCC, células (C) NB-4, e células HEL 92.1.7 (D)

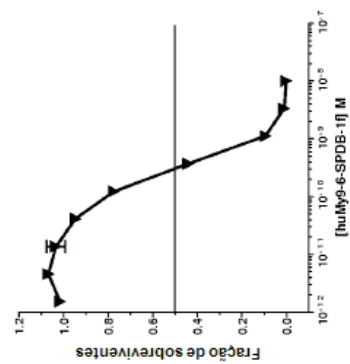
A)



B)



C)



D)

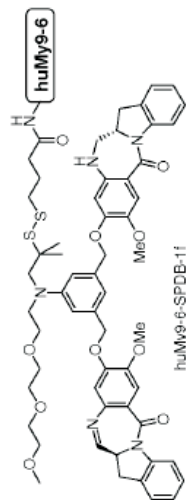
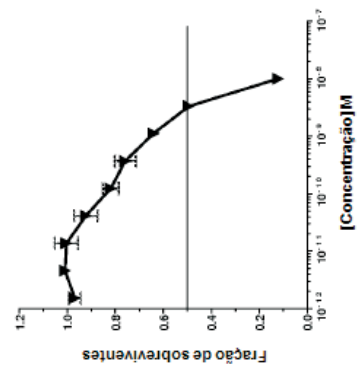


FIG. 21

Atividade antiproliferativa comparando (A) huMY 9-6-SPDB-1f e (B) huMy9-6-sulfoSPDB-1f, e (C) huMy9-6-BMPS-1f contra células HL60/QC (Ag+) com e sem Bloqueio de Sítios de Ligação ao Antígeno

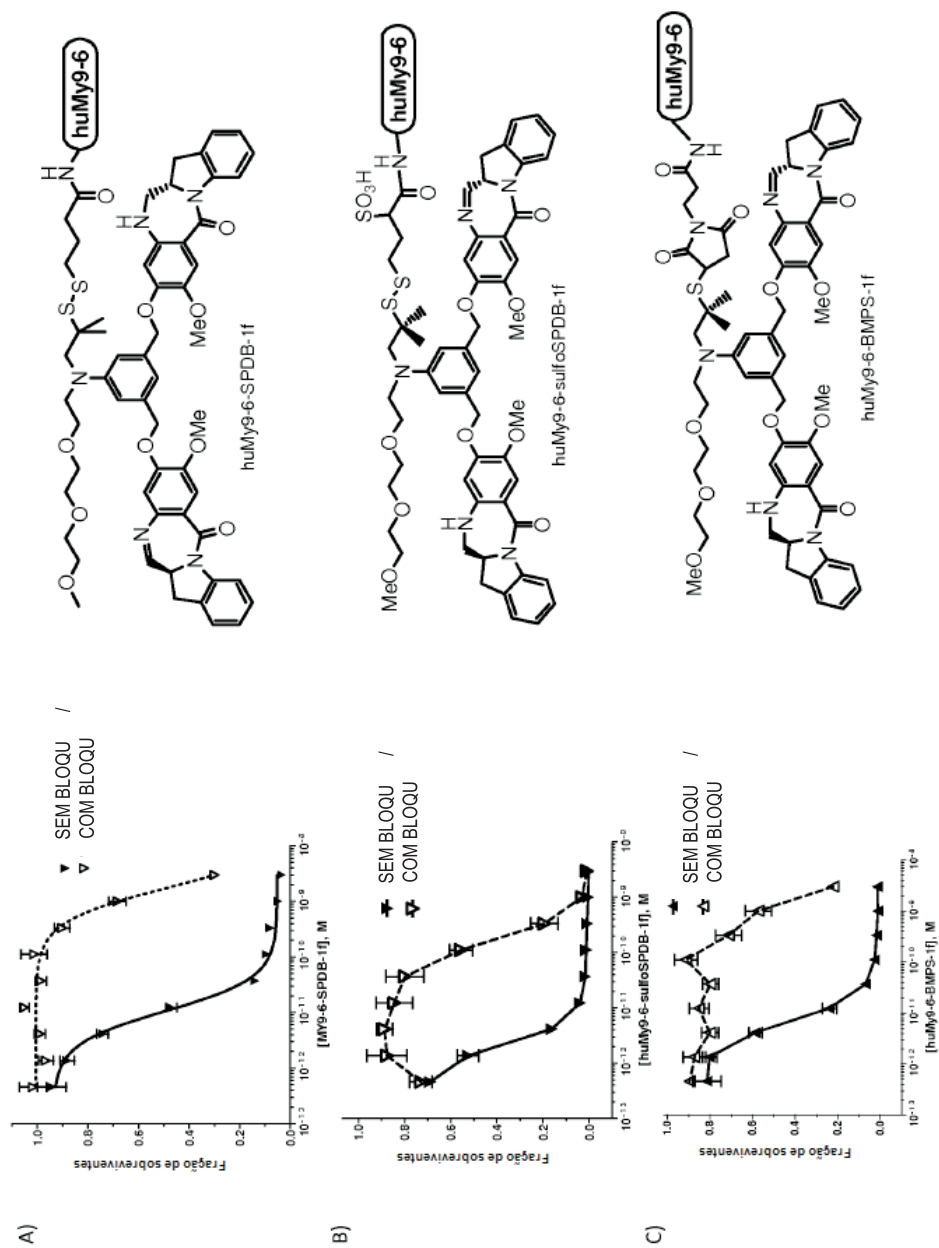


FIG. 22

Atividade antiproliferativa comparando (A) chB38.1-SPDB-1fe (B) chB38.1-sulfoSPDB-1f contra células COLO205 (Ag+)

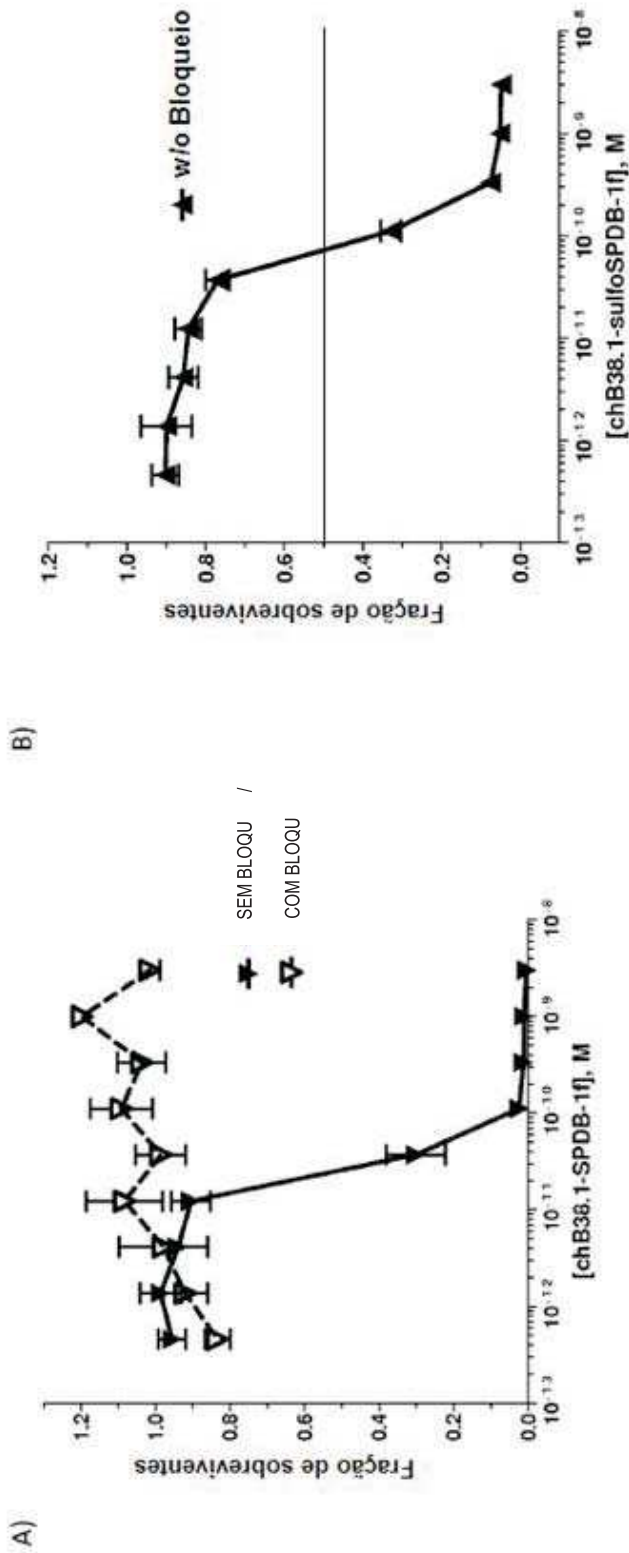
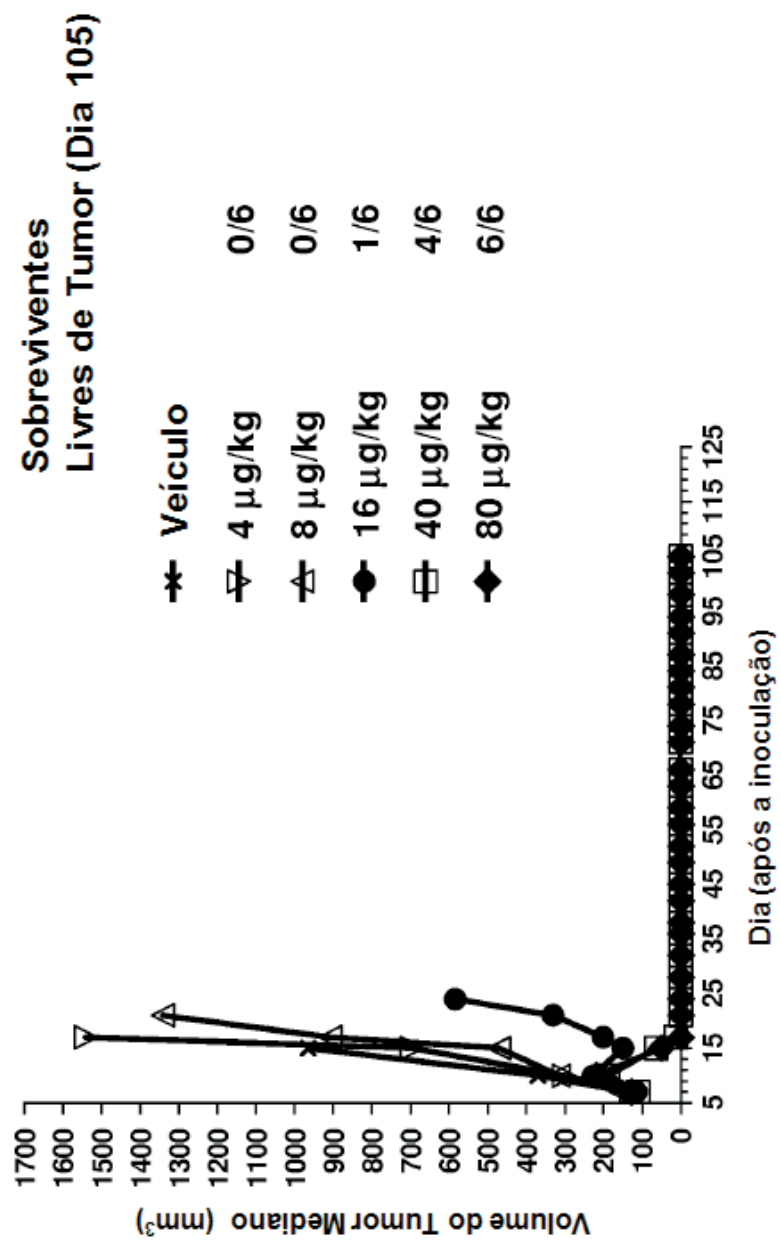


FIG. 23

Eficácia *in vivo* de huMy9-6-SPDB-1f em HL60/QC Camundongos Puros Contendo Tumor



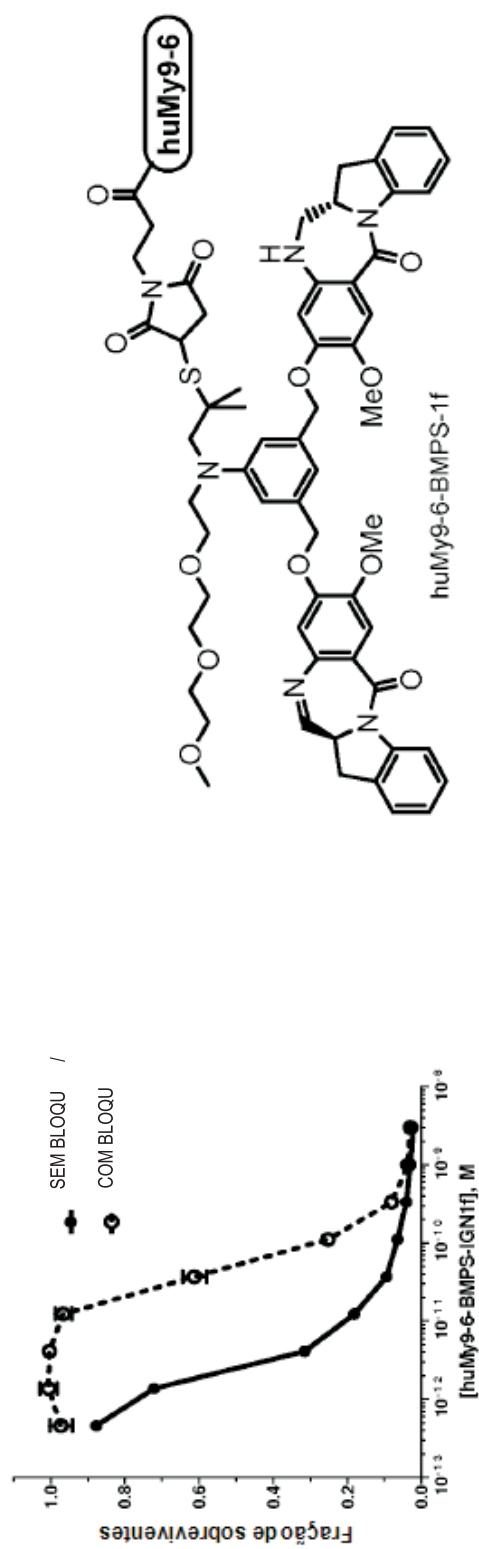


FIG. 25

Eficácia *in vivo* de huMy9-6-BMPS-1f em MOLM-13 Camundongos Puros Contendo Tumor

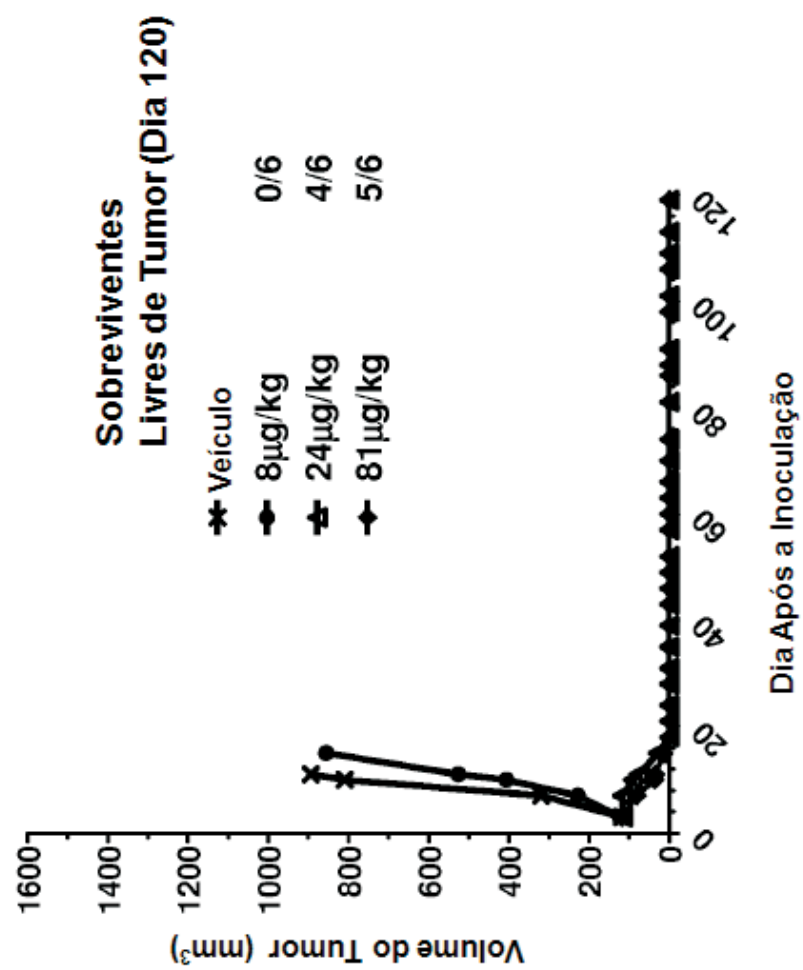


FIG. 26

Esquema de Síntese Representativa para um Conjugado de Folato Sulfonato/Composto Citotóxico

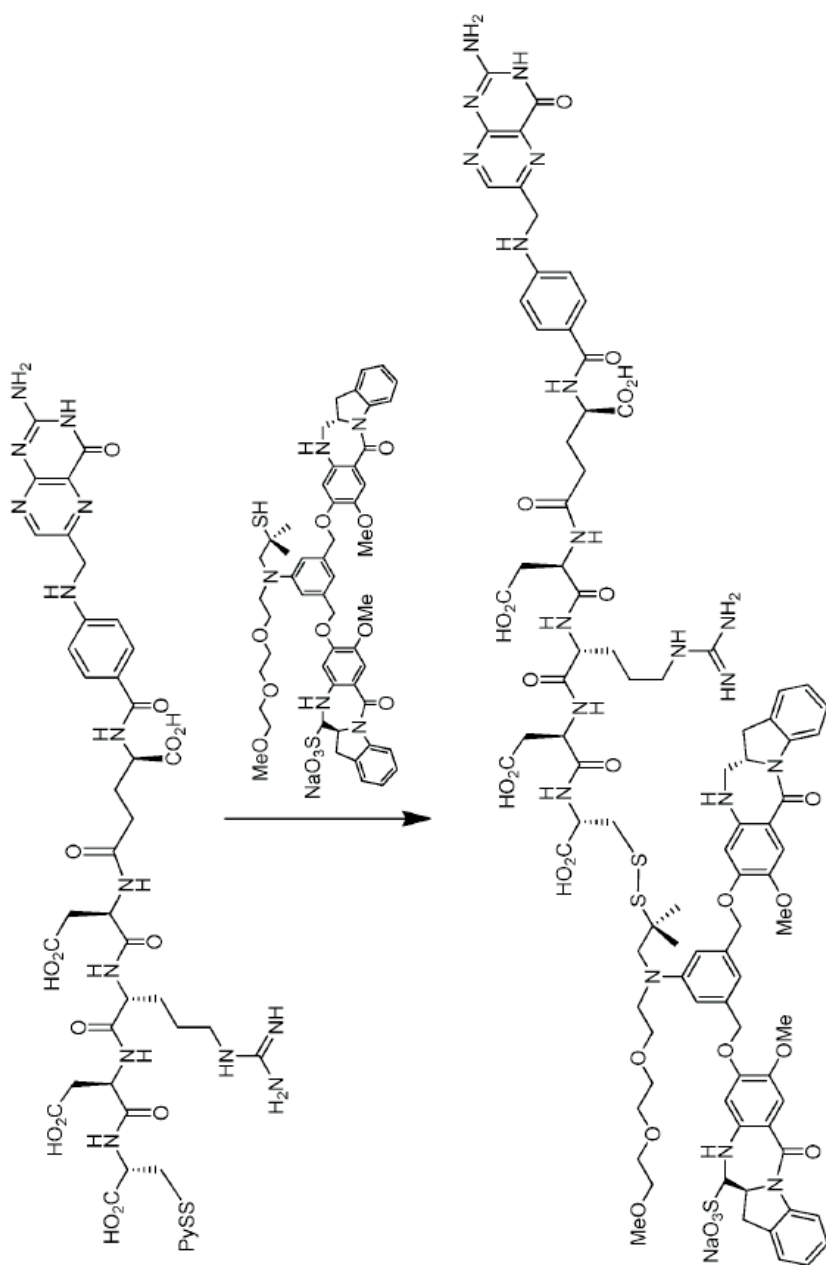


FIG. 27

Eficácia *in vivo* de huMy9-6-droga **2** em MOLM-13 Camundongos Puros Contendo Tumor

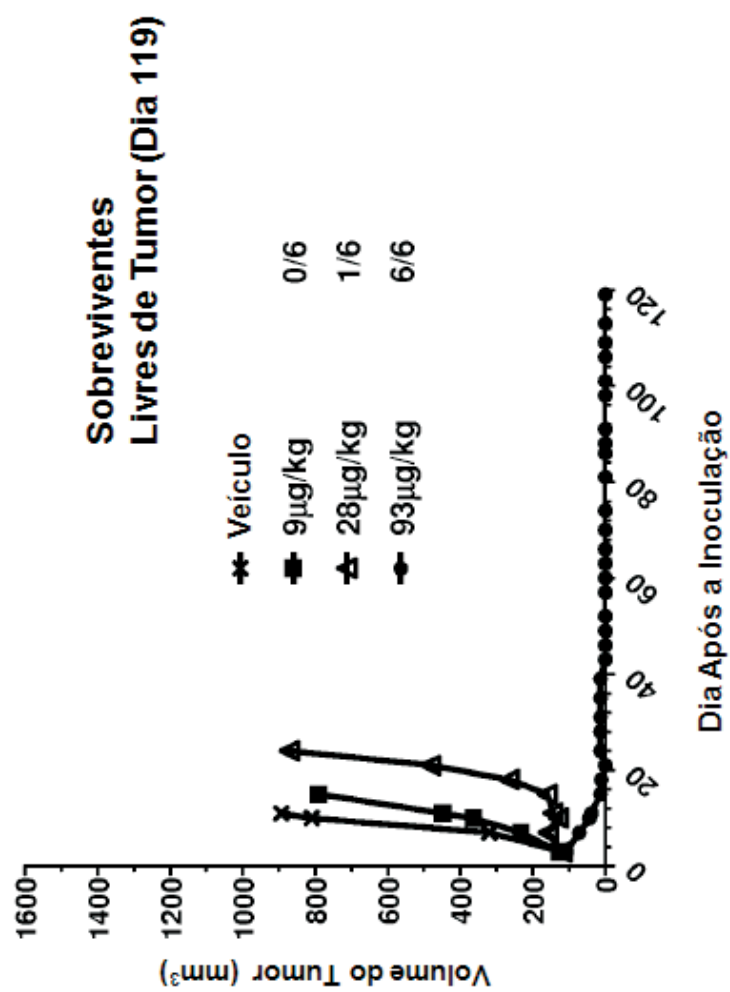


FIG. 28

