



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 546**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 47/48</b> (2006.01)	<b>A61P 35/00</b> (2006.01)
<b>C07D 209/42</b> (2006.01)	<b>C07D 209/60</b> (2006.01)
<b>C07D 403/14</b> (2006.01)	<b>C07D 405/12</b> (2006.01)
<b>C07F 9/572</b> (2006.01)	<b>C07F 9/6558</b> (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03714044 .9**

96 Fecha de presentación : **20.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1492526**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **Profármacos conjugados de análogos de CC-1065.**

30 Prioridad: **05.04.2002 US 116053**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2010**

73 Titular/es: **IMMUNOGEN, Inc.**  
**830 Winter Street**  
**Waltham, Massachusetts 02451, US**

72 Inventor/es: **Zhao, Robert, Yongxin y**  
**Chari, Ravi, V.J.**

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 347 546 T3

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

**Descripción****CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** La presente invención se refiere a nuevos profármacos de agentes citotóxicos y a sus usos terapéuticos. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos profármacos de agentes citotóxicos que son análogos de CC-1065 y que comprenden tanto un resto para el enlace químico a un agente de unión celular como un grupo protector que se escinde *in vivo*. Los profármacos pueden unirse químicamente a agentes de unión a célula para proporcionar agentes terapéuticos capaces de activarse y liberarse *in vivo* y suministrarse a poblaciones de células específicas de una manera dirigida.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** Han aparecido muchos informes que apuntan a la dirección de células tumorales con conjugados de anticuerpos monoclonales-fármacos {Sela et al, en Immunoconjugates, págs. 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al, en Targeted Drugs, págs.1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al, en Antibody Mediated Delivery Systems, págs. 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al, en Antibody Mediated Delivery Systems, págs. 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al, en Antibody Mediated Delivery Systems, págs. 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K.Krauer, 2 J. Drug Targeting, 183-215 (1994); R.V. J. Chari, 31 Adv. Drug Delivery Revs., 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, en Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy, 317-338, ACS Symposium Series 796; e I. Ojima et al eds, American Chemical Society 2001}. Se han conjugado fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C., clorambucilo, calicheamicina y maitansinoides con una diversidad de anticuerpos monoclonales murinos. En algunos casos, las moléculas farmacológicas estaban unidas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula transportadora intermediaria tal como albúmina de suero {Garnett et al, 46 Cancer Res. 2407-2412 (1986); Ohkawa et al, 23 Cancer Immunol. Immunother. 81-86 (1986); Endo et al, 47 Cancer Res. 1076-1080 (1980)}, dextrano {Hurwitz et al, 2 Appl. Biochem. 25-35 (1980); Manabi et al, 34 Biochem. Pharmacol. 289-291 (1985); Dillman et al, 46 Cancer Res. 4886-4891 (1986); y Shoval et al, 85 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 8276-8280 (1988)}, o ácido poliglutámico {Tsukada et al, 73 J. Natl. Canc. Inst. 721-729 (1984); Kato et al, 27 J. Med. Chem. 1602-1607 (1984); Tsukada et al, 52 Br. J. Cancer 111-116 (1985)}.

**[0003]** Una amplia serie de enlazadores se encuentran actualmente disponibles para la preparación de dichos inmunoconjugados, incluyendo los enlazadores escindibles y los no escindibles. Sin embargo, ensayos de citotoxicidad *in vitro*, han revelado que los conjugados anticuerpo-fármaco casi nunca consiguen la misma potencia citotóxica que los fármacos no conjugados libres. Esto ha sugerido que los mecanismos mediante los cuales las moléculas farmacológicas se liberan de los anticuerpos conjugados son muy ineficaces. Anteriores trabajos en el área de las inmunotoxinas demostraron que los conjugados formados mediante puentes disulfuro entre anticuerpos monoclonales y toxinas de proteínas catalíticamente activas era más citotóxicos que los conjugados que contenían otros enlazadores {Lambert et al, 260 J. Biol. Chem. 12035-12041 (1985); Lambert et al, en Immunotoxins 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al, 48 Cancer Res. 2610-2617 (1988)}. Esta citotoxicidad mejorada se atribuyó a la alta concentración intracelular del glutatión reducido contribuyendo a la escisión eficaz del enlace disulfuro entre la molécula de anticuerpo y la toxina. Los primeros ejemplos de fármacos altamente citotóxicos fueron los maitansinoides y la calicheamicina de fármacos de elevada citotoxicidad que se habían unido a anticuerpos monoclonales mediante enlaces disulfuro. Se ha demostrado que los conjugados de anticuerpo de estos fármacos poseen elevada potencia *in vitro* y actividad antitumoral excepcional en modelos de xenoinjertos tumorales humanos en ratones {R. V. J. Chari et al., 52 Cancer Res., 127-131 (1992); C. Liu et al., 93, Proc. Natl. Acad. Sci., 8618-8623 (1996); L.M. Hinman et al., 53, Cancer Res., 3536-3542 (1993); y P.R. Hamann et al, 13, BioConjugate Chem., 40-46 (2002)}.

**[0004]** Un candidato atractivo para la preparación de dichos conjugados citotóxicos es CC-1065, que es un potente antibiótico antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cancerosos comúnmente usados; tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina {B.K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)}.

**[0005]** La estructura de CC-1065 (Compuesto 1, **FIG. 1A**) se ha determinado por cristalografía por rayos X {Martin, D. G. et al, 33 J. Antibiotics 902-903 (1980) y Chidester, C. G., et al, 103 J. Am. Chem. Soc. 7629-7635 (1981)}. La molécula de CC-1065 consta de 3 restos pirroloindol sustituidos unidos por enlaces amida. La subunidad "A" tiene un anillo ciclopropil que contiene solamente carbonos asimétricos en la molécula. Aunque la configuración relativa de estos carbonos

solamente está disponible a partir de datos de rayos X, la configuración absoluta se ha deducido como 3b-*R*, 4a-*S*, usando ADN como un reactivo quiral {Hurley, L. H. et al, 226 Science 843-844 (1984)}. Las subunidades “B” y “C” de CC-1065 son restos pirroloindol idénticos.

- 5    **[0006]** La potencia citotóxica de CC-1065 se ha correlacionado con su actividad alquilante y su actividad intercalante de ADN o de unión a ADN. Estas dos actividades residen en partes distintas de la molécula. De esta manera, la actividad alquilante está contenida en la subunidad ciclopropapirroloindol (CPI) y la actividad de unión a ADN reside en las dos subunidades pirroloindol (**FIG. 1A**).
- 10   **[0007]** Sin embargo, aunque CC-1065 tiene determinadas características atractivas como un agente citotóxico, tiene limitaciones en el uso terapéutico. La administración de CC-1065 a ratones produce una hepatotoxicidad retardada que conduce a la mortalidad 50 días después de una sola dosis intravenosa de 12,5 µg/kg {V. L. Reynolds et al., J. Antibiotics, XXIX, 319-334 (1986)}. Esto ha
- 15   estimulado esfuerzos para desarrollar análogos que no causen toxicidad retardada y se ha descrito la síntesis de análogos más simples modelados sobre CC-1065 {M.A. Warpehoski et al., J. Med. Chem., 31, 590-603 (1988)}. En otra serie de análogos, el resto CPI se sustituyó por un resto ciclopropabenzoindol (CBI) {D.L. Boger et al., J. Org. Chem., 55, 5823-5833, (1990), D.L. Boger et al., BioOrg. Med.
- 20   Chem. Lett., 1, 115-120 (1991)}. Estos compuestos mantienen la alta potencia *in vitro* del fármaco parental, sin causar toxicidad retardada en ratones. Al igual que CC-1065, estos compuestos son agentes alquilantes que se unen al surco menor del ADN de una manera covalente para producir la muerte celular. Sin embargo, la evaluación clínica de los análogos más prometedores, Adozelesina y Carzelesina,
- 25   ha conducido a resultados decepcionantes {B.F. Foster et al., Investigational New Drugs, 13, 321-326 (1996); I. Wolff et al., Clin. Cancer Res., 2,1717-1723 (1996)}. Estos fármacos muestran escasos efectos terapéuticos debido a su alta toxicidad sistémica.
- 30   **[0008]** La eficacia terapéutica de los análogos de CC-1065 puede mejorarse enormemente cambiando la distribución *in vivo* mediante el suministro dirigido al sitio tumoral, dando como resultado una menor toxicidad con respecto a los tejidos no diana, y por lo tanto, menor toxicidad sistémica. Para conseguir este objetivo, se han descrito conjugados de análogos y derivados de CC-1065 con agentes de unión a célula que dirigen específicamente células tumorales diana {Patentes de
- 35   Estados Unidos N° 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545}. Estos conjugados muestran

típicamente alta citotoxicidad específica diana *in vitro*, y excepcional actividad anti-tumoral en modelos de xenoinjertos tumorales humanos en ratones {R.V. J. Chari et al., Cancer Res., 55,4079-4084 (1995)}.

[0009] Típicamente, los agentes de unión a célula sólo son solubles en medio acuoso y habitualmente se almacenan en soluciones acuosas. Por lo tanto, estos análogos deberían poseer suficiente hidrosolubilidad para permitir la reacción eficaz con agentes de unión a célula y posterior formulación en solución acuosa. Además, para que los conjugados de agentes de unión a célula tengan una vida útil conveniente, es importante que los análogos de CC-1065 que están unidos a estos agentes de unión a célula sean estables durante un periodo de tiempo prolongado en soluciones acuosas.

[0010] Los análogos de CC-1065 descritos hasta el momento (véanse, por ejemplo las **FIGS 1B** y **1C**) sólo son poco hidrosolubles. Debido a la escasa solubilidad de los análogos de CC-1065, las reacciones de conjugación con los agentes de unión a célula actualmente tienen que realizarse en soluciones acuosas extremadamente diluidas. Por lo tanto, estos profármacos deberían tener potenciada la hidrosolubilidad en comparación con los fármacos parentales.

[0011] Además, los análogos CC-1065 que se han descrito hasta el momento son muy inestables en soluciones acuosas por las siguientes razones. La forma seco del fármaco se transforma espontáneamente en la forma ciclopropilo, que después puede alquilatar al ADN, si está presente. Sin embargo, la reacción de competencia de la forma ciclopropilo con agua da como resultado la apertura del anillo ciclopropilo para producir el compuesto hidroxilo, que es inactivo. Por lo tanto, existe una necesidad para proteger la parte reactiva de los análogos de CC-1065 para ampliar su vida útil en solución acuosa, por ejemplo, mediante el desarrollo de profármacos de análogos de CC-1065.

[0012] Existe por lo tanto una necesidad para desarrollar profármacos de análogos de CC-1065 que sean muy estables después del almacenamiento en soluciones acuosas. Preferiblemente, estos profármacos solamente deberían transformarse en fármacos activos *in vivo*. Una vez que el profármaco se infunde a un paciente, preferiblemente éste debería transformarse de manera eficaz en un fármaco activo.

[0013] La carzelesina es un profármaco en el que grupo fenólico en la adozelesina está protegido como un fenil carbamato {L.H. Li et al., Cancer Res., 52, 4904-4913 (1992)}. Sin embargo, este profármaco es demasiado inestable para el

uso terapéutico y tampoco ofrece ningún aumento de hidrosolubilidad en comparación con el fármaco parental. En un segundo ejemplo, el resto fenólico de un análogo CC-1065 se glicosiló para producir un profármaco (Patente de Estados Unidos N° 5.646.298). Sin embargo, este profármaco no se transforma en fármaco activo *in vivo* y requiere la administración adicional de una enzima procedente de una fuente bacteriana para transformarlo en la forma citotóxica.

**[0014]** Existen algunos ejemplos de fármacos anticancerosos, no relacionados con CC-1065, que se han transformado en profármacos hidrosolubles. En el fármaco anticanceroso irinotecan, el grupo fenólico está protegido por un 4-piperidino-piperidino carbamato. Se ha indicado que este grupo protector confiere hidrosolubilidad al fármaco. Además, el profármaco se transforma fácilmente *in vivo* en fármaco activo en seres humanos, presumiblemente por la enzima carboxilesterasa, que se encuentra de manera natural en el suero humano, tejido tumoral y en algunos órganos {A. Sparreboom, 4, Clin. Cancer Res., 2747-2754 (1998). L.P. Rivory et al., 52, Biochem Pharmacol., 1103-1111 (1996)}.

**[0015]** De manera similar, el fármaco anticanceroso fosfato de etopósido es un ejemplo de un profármaco que tiene un grupo de protección fosfato y se transforma rápidamente en fármaco activo *in vivo*, presumiblemente mediante hidrólisis por fosfatasa alcalina endógena {S.Z. Fields et al., 1 Clin. Cancer Res., 105-111 (1995)}.

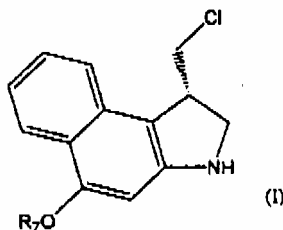
**[0016]** Borger et al describen, en Synthesis 1999, N° SI, páginas 1505 - 1509, análogos profármacos de CBI de CC-1065 y las duocarmicinas. Los profármacos, en los que el grupo fenol en la posición 7 está oculto por un carbamato de una amina terciaria, se describen como inactivos en diferentes líneas celulares.

**[0017]** Por lo tanto, existe una necesidad de análogos de CC-1065 que tengan solubilidad y estabilidad aumentadas en solución acuosa, para facilitar su conjugación con agentes de unión a célula en soluciones acuosas, conservando al mismo tiempo su actividad biológica. Además, para reducir los efectos secundarios tóxicos, sería ventajoso proporcionar el análogo de CC-1065 en forma de un profármaco que se transforme en el fármaco citotóxico predominantemente en el sitio terapéutico deseado y preferiblemente a través de la acción de agentes endógenos.

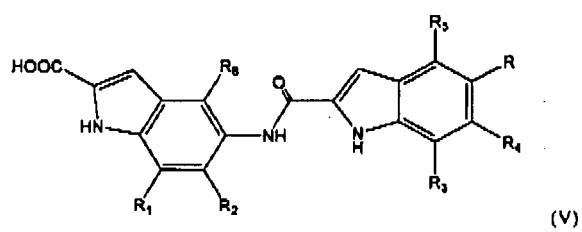
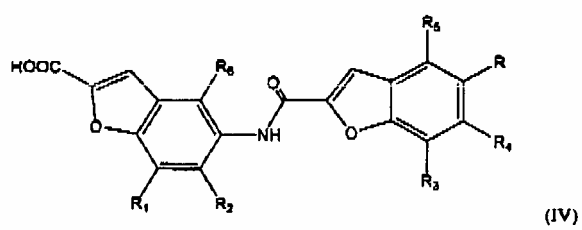
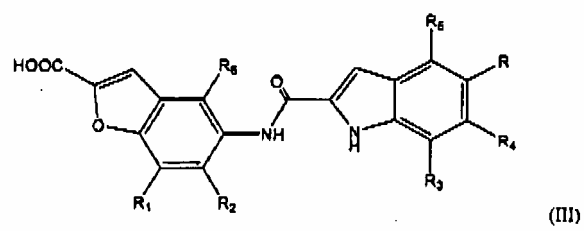
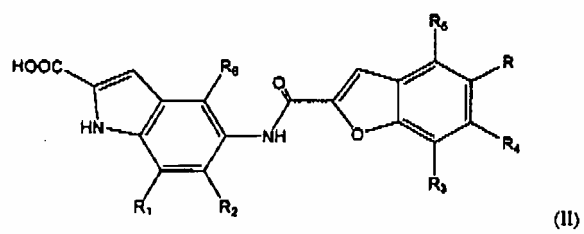
## RESUMEN DE LA INVENCION

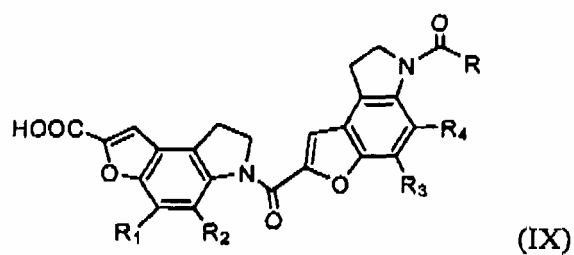
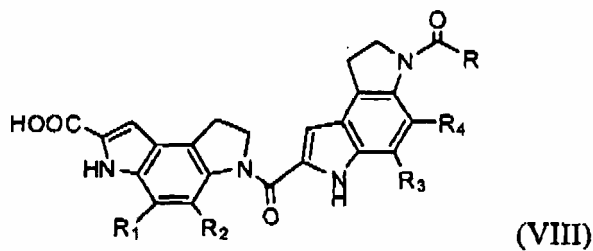
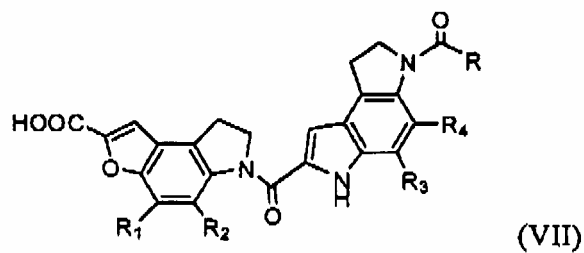
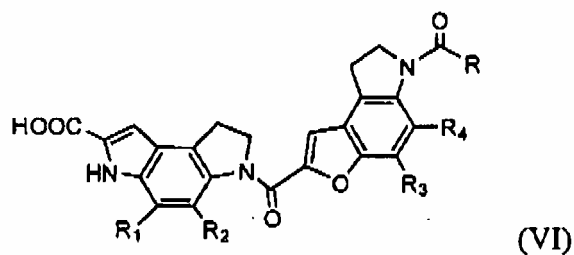
**[0018]** El objeto de la presente invención es proporcionar profármacos de análogos de CC-1065, que tengan estabilidad y solubilidad mejorada en medio acuoso. Estos y otros objetivos se han alcanzado proporcionando profármacos que comprenden un análogo de un fármaco citotóxico que contiene *secociclopropabenzoindol* en el que el grupo fenólico de la porción de alquilación de la molécula está protegido con una funcionalidad que hace al fármaco estable después del almacenamiento en una solución acuosa. Además, el grupo protector confiere una solubilidad mejorada al fármaco en comparación con la de un grupo sin proteger. El grupo protector se escinde fácilmente *in vivo* para dar el fármaco activo correspondiente. En los profármacos descritos en el presente documento, el sustituyente fenólico está protegido como un piperazino carbamato, un 4-piperidino-piperidino carbamato o como un fosfato, cada uno de los cuales posee una carga a pH fisiológico y, por lo tanto, tienen una solubilidad en agua mejorada. Para mejorar adicionalmente la solubilidad en agua, se ha introducido un espaciador de polietilenglicol opcional en el grupo de unión entre la subunidad de indolilo C terminal y el grupo escindible, tal como un grupo disulfuro. La introducción de este espaciador no altera la potencia del fármaco.

**[0019]** Desde un primer aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un profármaco que comprende un análogo de un fármaco citotóxico que contiene *secociclopropabenzoindol* seleccionado entre el grupo que consiste en análogos formados a partir de una primera subunidad de fórmula (I) enlazada covalentemente con una segunda subunidad de la fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) por medio de un enlace amida desde el grupo amino secundario del resto pirrolo de la primera subunidad al carboxilo C-2 de la segunda subunidad, donde la fórmula (I) es como se indica a continuación:



donde las fórmulas (II)-(IX) son como se indica a continuación:





5

en las que R representa un enlazador capaz de conjugar dicho profármaco con un agente de unión a célula por medio de un enlace disulfuro, un grupo inestable a ácido, un grupo inestable a la luz, un grupo inestable a peptidasa o un grupo inestable a esterasa; en las que cada una de R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> es independientemente

10 hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y en las que R<sub>7</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en un piperazino carbamato, un 4-piperidino-piperidino carbamato y un fosfato.

**[0020]** Preferiblemente la conjugación se realiza mediante un enlace disulfuro. El enlazador puede comprender un espaciador de polietilenglicol.

**[0021]** Los profármacos de la invención pueden usarse en conjugados citotóxicos en los que un agente de unión a célula está enlazado con uno o más de los profármacos de la presente invención. Por lo tanto, la invención también proporciona un profármaco conjugado que comprende un agente de unión a célula enlazado con uno o más de los profármacos de la invención, en los que el agente de unión a célula es un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal que contiene al menos un sitio de unión o un anticuerpo monocatenario. Los agentes de unión a célula incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos, interferones, linfocinas, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que contienen dichos conjugados.

**[0022]** Por lo tanto, la invención también proporciona una composición que comprende el profármaco conjugado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0023]** La invención también proporciona un profármaco conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.

**[0024]** La invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento de la poblaciones de células seleccionadas *in vitro* o *ex vivo* que comprende poner en contacto una población de células o un tejido que se supone que tiene dicha población de células seleccionada con una cantidad citotóxica de un conjugado o de una composición de la invención.

**[0025]** Los conjugados citotóxicos pueden usarse en un medicamento para el tratamiento de un sujeto administrando una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anterior. De acuerdo con el tipo de célula al que se une el agente de unión a célula seleccionado, pueden tratarse muchas enfermedades *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, el tratamiento de muchos tipos de cánceres, incluyendo linfomas, leucemias, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón y páncreas.

**[0026]** Por lo tanto, hay profármacos proporcionados de análogos de CC-1065 que tienen una solubilidad y estabilidad en solución acuosa mejoradas y que mantienen citotoxicidad cuanto se activan para producir un fármaco de alquilación, y que son útiles a la hora de dirigirse a tipos celulares específicos por medio de conjugación con el agente de unión a célula específico.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURA

**[0027]**

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

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

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

La **FIG. 3** muestra las estructuras de profármacos ejemplares que contienen polietilenglicol de la presente invención.

Las **FIG. 4A** y **B** son esquemas de síntesis para la preparación de (S)-N-[2-  
 {(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-metilpiperazino)carboniloxi]-3H-  
 benzo(e)indol-3-il}-carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropil)-  
 amino]-1H-indol-2-carboxamida (DC2) y (S)-N-[2-  
 {(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxi]-3H-benzo(e)indol-3-il}-  
 carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida  
 (DC3).

La **FIG. 5** muestra esquemas para la síntesis de versiones PEGiladas de DC1, DC2 y DC3, que son DC5, DC6 y DC7, respectivamente.

La **FIG. 6** muestra dos esquemas sintéticos para la preparación de (S)-N-[2-  
 {(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-(fosfonoxi)-3H-benzo(e)indol-3-il}-carbonil]-1H-  
 indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropil)-amino]-1H-indol-2-carboxamida  
 (DC4)).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0028]** La presente invención ha encontrado que la estabilidad, la solubilidad en agua y la utilidad de ciertos análogos de CC-1065 se mejoran mediante la protección del resto de alquilación del análogo con un grupo protector adecuado. Por lo tanto, los inventores han proporcionado profármacos de análogos de CC-1065 que tienen solubilidad y estabilidad acuosa mejoradas y que adicionalmente son capaces de enlazarse a los agentes de unión a célula por lo que la eficacia terapéutica de dichos profármacos de análogos de CC-1065 se mejora cambiando la distribución *in vivo* a través del suministro dirigido del profármaco al sitio del tumor, dando como resultado una baja toxicidad en los tejidos que no son diana y, por lo tanto una menor toxicidad sistémica. Después del suministro del profármaco, las sustancias endógenas convierten sustancialmente el profármaco en su forma de fármaco activa y, en realizaciones que tienen un enlazador escindible para el agente de unión a célula, se suministra la forma de fármaco activo del análogo de

CC-1065, potenciando adicionalmente de esta manera su actividad citotóxica. Como alternativa, el enlazador al agente de unión a célula puede escindirse, en primer lugar, dentro de la célula diana para suministrar el profármaco, seguido de conversión endógena en el fármaco activo.

- 5 **[0029]** Para alcanzar este objetivo, los inventores sintetizaron profármacos ejemplares (**FIG. 2-6**) de análogos de CC-1065 que son profármacos citotóxicos que contienen seco-ciclopropabenzoindol (CBI) que comprenden: (a) una primera unidad de fórmula (I) que está protegida en el hidroxilo fenólico con un grupo protector para potenciar la estabilidad y la solubilidad en agua y que se escinde *in*  
10 *vivo*, y (b) una segunda subunidad que tiene la estructura representada por una de las fórmulas (II)-(IX) y que comprende un grupo enlazador para la conjugación del profármaco con un agente de unión de células. El grupo enlazador puede contener un espaciador de polietilenglicol (**FIG. 3**). La eliminación del grupo protector del profármaco produce una forma activa del fármaco que mantiene la alta citotoxicidad  
15 del fármaco parental. El enlazador se usa para la conjugación con los agentes de unión a célula, preferiblemente mediante un enlace disulfuro.

- [0030]** Se ha mostrado previamente que el enlazador de los fármacos altamente citotóxicos a los anticuerpos que usan un enlace escindible, tal como un enlace disulfuro, asegura el suministro de un fármaco totalmente activo al interior de la  
20 célula, y que tales conjugados son citotóxicos de una manera específica de antígeno {R. V. J. Chari et al, 52 Cancer Res. 127-131 (1992); R.V.J. Chari et al., 55 Cancer Res. 4079-4084 (1995); y las Patentes de Estados Unidos N° 5.208.020 y 5.475.092}. En la presente invención, los inventores describen la síntesis de profármacos de análogos de CC-1065, procedimientos para su conjugación con  
25 anticuerpos monoclonales y para la medición de la citotoxicidad y especificidad *in vitro* de tales conjugados. Por lo tanto, la invención proporciona compuestos útiles para la preparación de agentes terapéuticos dirigidos a la eliminación de células enfermas o anormales que deben eliminarse o lisarse, tales como células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos,  
30 células infectadas por parásitos, células autoinmunes (células que producen auto-anticuerpos), células activadas (aquellas implicadas en la enfermedad de rechazo a injerto o injerto contra hospedador) o cualquier otro tipo de células enfermas o anómalas, al mismo tiempo que muestran efectos secundarios mínimos.

- [0031]** Por lo tanto, esta invención muestra la síntesis de análogos de profármaco y derivados de CC-1065 que pueden unirse químicamente a los agentes de unión a  
35 célula y que mantienen, después de la retirada del grupo protector, la alta citotoxicidad del compuesto parental CC-1065. Además, después de la activación,

estos compuestos cuando se enlazan a un agente de unión a célula son citotóxicos con las células que une el agente de unión a célula y son mucho menos tóxicos para las células que no son diana.

## 5 Profármacos de la Presente Invención

**[0032]** Los profármacos de acuerdo con la presente invención comprenden un análogo de CC-1065 en el que el grupo fenólico de la porción de alquilación de la molécula está protegido y el profármaco comprende adicionalmente un enlazador capaz de conjugar el profármaco con el agente de unión a célula.

10 **[0033]** De acuerdo con la presente invención, el profármaco del análogo de CC-1065 tiene una primera subunidad que es un seco-CBI (unidad ciclopropabenzoindol) en su forma abierta de clorometilo, en la que la primera subunidad tiene un hidroxilo fenólico que está protegido mediante un grupo protector soluble en agua que puede escindirse *in vivo*. La segunda subunidad del  
15 profármaco de ciertas realizaciones de la presente invención comprende un análogo de las subunidades B y C combinadas de CC-1065 (**FIG. 1**) que son derivados de 2-carboxi-indol o 2-carboxi-benzofurano, o ambos, y está representadas mediante las fórmulas (II)-(IX). Como puede deducirse del CC-1065 natural y de las propiedades de los análogos que se han publicado {por ejemplo  
20 Warpehoski et al, 31 J. Med. Chem. 590-603 (1988), Boger et al, 66 J. Org. Chem. 6654-6661 (2001)}, las subunidades B y C también pueden llevar diferentes sustituyentes en diferentes posiciones de los anillos indol y benzofurano, que se corresponden con las posiciones R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> de las fórmulas (II)-(IX), y todavía mantiene una actividad citotóxica potente.

25 **[0034]** Para unir el profármaco del análogo de CC-1065 a un agente de unión a célula, el profármaco debe incluir en primer lugar un resto que permita que los derivados se unan a un agente de unión a célula por medio de un enlace escindible tal como un enlace disulfuro, un grupo inestable a ácido, un grupo inestable a la luz, un grupo inestable a peptidasa o un grupo inestable a esterasa. Los análogos de  
30 profármaco se preparan para que contengan un resto necesario para unir el análogo al agente de unión a célula por medio de un enlace disulfuro, un grupo inestable a ácido, un grupo inestable a la luz, un grupo inestable a peptidasa o un grupo inestable a esterasa. Para potenciar adicionalmente la solubilidad en soluciones acuosas, el grupo de unión puede contener un espaciador de  
35 polietilenglicol (**FIG. 3**).

**[0035]** Preferiblemente, se usa un enlace disulfuro porque el ambiente reductor de la célula diana da como resultado la escisión del disulfuro y la liberación del

profármaco (o fármaco, dependiendo de la secuencia relativa de la escisión del profármaco del agente de unión a célula y de la hidrólisis del grupo protector) con un aumento asociado de la citotoxicidad.

- [0036]** Dentro de las fórmulas (II)-(IX), R representa un resto tal como se define en la reivindicación 1 que permite la unión del profármaco de un análogo de CC-1065 con un agente de unión a célula. El resto de unión puede contener un espaciador de polietilenglicol. Los ejemplos incluyen restos que permiten uniones mediante enlace disulfuro, un grupo inestable a ácido, un grupo inestable a la luz, un grupo inestable a peptidasa o un grupo inestable a esterasa, y son bien conocidos en la técnica {véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.846.545}. Los restos preferidos son aquellos que permiten la unión mediante un enlace disulfuro, por ejemplo un tiol (DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6, DC7) o un disulfuro (DC1-SMe, DC2-SMe, DC3-SMe, DC4-SMe, DC5-SMe, DC6-SMe, DC7-Sme, véase **FIG. 2-6**). Pueden usarse disulfuros mixtos que contienen cualquier grupo saliente terminal, tal como tiometilo (DC1-SMe, DC2-SMe, DC3-SMe, DC4-SMe, DC5-SMe, DC6-SMe, DC7-SMe), glutatión, alquil tiol, tiopiridilo, aril tiol siempre que dichos disulfuros sean capaces de experimentar una reacción de intercambio de disulfuro para el acoplamiento del profármaco a un agente de unión a célula. R puede comprender opcionalmente además una región espaciadora interpuesta entre el grupo reactivo de la porción que permite la unión y la porción derivada de 2-carboxi-indol o 2-carboxi-benzofurano. Las realizaciones preferidas incluyen  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{SZ}$ ,  $\text{NHCOC}_6\text{H}_4(\text{CH}_2)_m\text{SZ}$  u  $\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{SZ}$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SZ}$ ,  $\text{NHCOC}_6\text{H}_4(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SZ}$  u  $\text{O}(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SZ}$  en las que: Z representa H o  $\text{SR}_8$ , en el que  $\text{R}_8$  representa metilo, alquilo lineal, alquilo ramificado, alquilo cíclico, arilo simple o sustituido, o heterocíclico, y m representa un número entero de 1 a 10, y n representa un número entero de 4 a 1000. Los ejemplos de alquilos lineales representados por  $\text{R}_8$  incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Los ejemplos de alquilos ramificados representados por  $\text{R}_8$  incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo. Los ejemplos de alquilos cíclicos representados por  $\text{R}_8$  incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los ejemplos de arilos simples representados por  $\text{R}_8$  incluyen fenilo y naftilo. Los ejemplos de arilos sustituidos representados por  $\text{R}_8$  incluyen arilos tales como fenilo o naftilo sustituido con grupos alquilo, con halógenos, tales como Cl, Br, F, grupos nitro, grupos amino, grupos ácido sulfónico, grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo y grupos alcoxi. Los heterocíclicos representados por  $\text{R}_8$  son compuestos en los que los heteroátomos se seleccionan entre O, N y S, y los ejemplos incluyen furilo, pirrolilo,

piridilo, (por ejemplo, un grupo pirimidina 2-sustituido) y tiofeno. Las realizaciones más preferidas de R incluyen  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$  y  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{SSCH}_3$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SH}$  y  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SSCH}_3$ .

**[0037]** Dentro de las fórmulas (II)-(IX),  $R_1$  a  $R_6$ , que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente hidrógeno, alquilo lineal  $C_1$ - $C_3$ , metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido. Los ejemplos de sustituyentes que contienen grupos amino primarios son metil amino, etil amino e isopropil amino. Los ejemplos de sustituyentes que contienen grupos amino secundarios son dimetil amino, dietil amino y etil-propil amino. Los ejemplos de sustituyentes que contienen grupos amino terciarios son trimetil amino, trietil amino y etil-isopropilmetil amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen *N*-metil-acetamido, *N*-metilpropionamido, *N*-acetamido y *N*-propionamido.

**[0038]** Dentro de las fórmulas (II)-(IX),  $R_7$  puede ser un piperazino carbamato o 4-piperidino-piperidino carbamato. Estos grupos protectores son escindibles enzimáticamente mediante enzimas tales como carboxil esterasa, que aparecen en suero y plasma. Los grupos protectores fosfato son escindibles mediante enzimas fosfatasa tales como fosfatasa alcalina.

**[0039]** Los profármacos de análogos de CC-1065 que contienen disulfuro y que contienen mercapto de la presente invención pueden evaluarse por su capacidad para suprimir la proliferación de diversas líneas celulares no deseadas *in vitro*, sólo después de que se hayan activado. Por ejemplo, los profármacos que contienen grupos fosforilo, tales como DC4, pueden activarse mediante incubación con fosfatasas alcalinas disponibles en el mercado, mientras que los profármacos que contienen carbamato, tales como DC3 y DC4, pueden activarse mediante incubación con carboxil esterases disponibles en el mercado. Pueden usarse fácilmente líneas celulares tales como, por ejemplo, la línea KB de carcinoma epidermoide humano, la línea SK-BR-3 de tumor de mama humano y la línea Namalwa de linfoma de Burkitt para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células que van a evaluarse pueden exponerse a los compuestos durante 24 horas y las fracciones de las células supervivientes medirse en ensayos directos por métodos conocidos. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  pueden calcularse después a partir de los resultados de los ensayos.

#### **Preparación de Agentes de Unión a Célula**

**[0040]** La eficacia de los compuestos profármacos de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión a célula apropiado. Los agentes de unión a célula pueden ser de cualquier tipo actualmente

conocido o lleguen a conocerse, e incluyen péptidos y no péptidos. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (específicamente anticuerpos monoclonales) o un fragmento de un anticuerpo que contenga al menos un sitio de unión, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula. Los ejemplos más específicos de agentes de unión a célula que pueden usarse incluyen:

- anticuerpos monoclonales;
- anticuerpos monocatenarios
- 10 fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y F<sub>v</sub> {Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al, 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al, 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)};
- interferones;
- péptidos;
- 15 linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormonas tales como insulina, TRH (hormona de liberación de tirotropina), MSH (hormona estimulante de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos;
- factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias tales como EGF,
- 20 TGF $\alpha$ , factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)}; vitaminas, tales como folato y transferrina {O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem. 932-937 (1985)}.

**[0041]** La tecnología de anticuerpos monoclonales permite la producción de agentes de unión a célula extremadamente selectivos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. En la técnica se conocen particularmente bien técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos inmunizando ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, los antígenos aislados de la célula diana, virus completos, virus completos atenuados y proteínas virales tales como proteínas de cubierta viral.

30 **[0042]** La selección del agente de unión a célula apropiado es una cuestión de elección que depende de la población celular en particular que se va a dirigir, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales si se dispone de uno apropiado.

**[0043]** Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> murino que se une específicamente al antígeno CD33 {J.D. Griffin et al 8 Leukemia Res.,

521 (1984)} y puede usarse si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad de leucemia mielógena aguda (AML). De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es un IgG<sub>1</sub> murino, que se une al antígeno CD19 en las células B {Nadler et al, 131 J. Immunol. 244-250 (1983)} y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tales como linfoma no Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica.

**[0044]** Adicionalmente, el GM-CSF que se une a células mieloides puede usarse como un agente de unión a célula para células enfermas de leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención de rechazo de injerto en trasplante, para la terapia y prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador y para el tratamiento de leucemia aguda de células T. La MSH, que se une a melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma.

#### **Preparación de Conjugados de Profármacos**

**[0045]** Pueden formarse conjugados de los profármacos y un agente de unión a célula usando cualquiera de las técnicas actualmente conocidas o desarrolladas posteriormente. Puede prepararse un derivado indolilo, benzofuranilo, bis-indolilo, bis-benzofuranilo, indolil-benzofuranilo o benzofuranil-indolilo acoplado al análogo seco-CBI puede prepararse para contener un grupo amino libre y después unirse a un anticuerpo u otro agente de unión a célula mediante un enlazador inestable a ácido o mediante un enlazador inestable a la luz. Los compuestos del profármaco pueden condensarse con un péptido que tenga una secuencia adecuada y posteriormente unirse a un agente de unión a célula para producir un enlazador inestable a peptidasa. Los compuestos citotóxicos pueden prepararse para contener un grupo hidroxilo primario, que pueda succinilarse y unirse a un agente de unión a célula para producir un conjugado que pueda escindirse mediante esterases intracelulares para liberar el profármaco libre. Preferiblemente, los compuestos profarmacológicos se sintetizan para contener un grupo tiol libre o protegido, con o sin un espaciador que contenga PEG y después cada uno de los profármacos que contienen uno o más disulfuro o tiol se unen de manera covalente al agente de unión celular mediante un enlace disulfuro.

**[0046]** Los conjugados representativos de la invención son conjugados de profármacos de análogos de CC-1065 con anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormona estimuladora de melanocitos

(MSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH), estrógeno, análogos de estrógeno, andrógeno y análogos de andrógeno.

5 [0047] A continuación se describen ejemplos representativos de la preparación de diversos conjugados de profármacos de análogos de CC-1065 y agentes de unión a célula.

[0048] **Enlazadores disulfuro:** El anticuerpo N901 que se une al antígeno CD-56 que se expresa sobre la superficie de células de cáncer pulmonar de células pequeñas {J. D. Griffin, T. Hercend, R. Beveridge & S. F. Schlossman, J. Immunol, 130: 2947 (1983)} pueden usarse para la preparación de conjugados. El anticuerpo  
10 se modifica con N-succinimidil-3-piridilditio propionato como se ha descrito previamente {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, Biochem. J., 173: 723 (1978)} para introducir, en el promedio, 4 grupos piridilditio por molécula de anticuerpo. El anticuerpo modificado reacciona con el profármaco que contiene tiol para producir un conjugado con enlazador disulfuro.

15 [0049] **Enlazadores inestables a ácido:** Los profármacos de la presente invención que contengan grupos amino pueden unirse a anticuerpos y a otros agentes de unión a célula mediante un enlazador inestable a ácido como se ha descrito previamente {W. A. Blattler et al, Biochemistry 24, 1517-1524 (1985); Patentes de Estados Unidos N°: 4.542.225, 4.569.789, 4.618.492, 4.764.368}.

20 [0050] De manera similar, un profármaco de la presente invención que contenga grupos hidrazido pueden unirse a la parte carbohidrato de anticuerpos u otros agentes de unión a célula mediante un enlazador hidrazona inestable a ácido (para ejemplos de enlazadores hidrazona véase B. C. Laguzza et al, J. Med. Chem., 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al, Cancer Res., 50, 6600-6607 (1990)).

25 [0051] **Enlazadores inestables a la luz:** Los profármacos de la presente invención que contengan grupos amina pueden unirse a anticuerpos y a otros agentes de unión a célula mediante un enlazador inestable a la luz como se ha descrito previamente {P. Senter et al, Photochemistry and Photobiology, 42, 231-237 (1985); Patente de Estados Unidos N°: 4.625.014}.

30 [0052] **Enlazadores inestables a peptidasa:** Los profármacos de la presente invención que contengan grupos amina también pueden unirse a agentes de unión a célula mediante espaciadores peptídicos. Se ha demostrado previamente que pequeños espaciadores peptídicos entre fármacos y transportadores de proteínas macromoleculares son estables en suero pero se hidrolizan fácilmente mediante  
35 peptidasas intracelulares {A. Trouet et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 626-629

(1982)). Los profármacos que contienen grupos amino puede condensarse con péptidos usando agentes de condensación tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (EDC-HCl) para proporcionar un derivado peptídico que pueda unirse a los agentes de unión a célula.

- 5 **[0053] Enlazadores inestables a esterasa:** Los profármacos de la presente invención que llevan un grupo hidroxil alquilo pueden succinilarse con anhídrido succínico y después unirse a un agente de unión a célula para producir un conjugado que puede escindirse mediante esterasas intracelulares para liberar el fármaco libre. {Para ejemplos véase, E. Aboud-Pirak et al, Biochem Pharmacol., 38,  
10 641-648 (1989)}.

**[0054]** Los conjugados preparados mediante los métodos anteriores pueden purificarse por cromatografía en columna convencional o por HPLC.

- [0055]** Preferiblemente los conjugados entre anticuerpos monoclonales o agentes de unión a célula y profármacos de la presente invención son aquéllos que se unen  
15 mediante un enlace disulfuro, como se ha indicado anteriormente. Dichos conjugados de unión a célula se preparan por métodos conocidos tales como modificando anticuerpos monoclonales con succinimidil piridil-ditiopropionato (SPDP) {Carlsson et al, 173 Biochem. J. 723-737 (1978)}. Después, el grupo tiopiridilo resultante se desplaza por tratamiento con el profármaco que contiene tiol  
20 para producir conjugados unidos por disulfuro. Los conjugados que contienen de 1 a 10 profármacos unidos mediante un puente disulfuro se preparan fácilmente mediante este método. En la Patente Estados Unidos N°: 5.585.499 se describe por completo la conjugación mediante este método.

## 25 **Citotoxicidad *In Vitro* de Conjugados entre Agentes de Unión a Célula y Profármacos de la Presente Invención**

- [0056]** La citotoxicidad de los profármacos de la presente invención y sus conjugados con los agentes de unión a célula pueden medirse después de la escisión del grupo de protección y la conversión en el fármaco activo. La  
30 citotoxicidad respecto a líneas celulares no adherentes tales como Namalwa y SW2 puede medirse por retro-extrapolación de curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher et al, 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985). La citotoxicidad de estos compuestos respecto a líneas celulares adherentes tales como A-375 y SCaBER puede determinarse por ensayos clonogénicos como se describe en  
35 Goldmacher et al, 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986).

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

**[0057]** La presente invención también proporciona un agente terapéutico para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende:

- 5           (a) una cantidad citotóxica de uno o más de los profármacos anteriormente descritos unidos a un agente de unión a célula y  
            (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0058]** De manera similar, la presente invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que  
10 comprende poner en contacto una población o tejido celular, que supuestamente contiene células procedentes de dicha población celular seleccionada, con una cantidad citotóxica de un agente citotóxico que comprende uno o más de los profármacos descritos anteriormente unidos a un agente de unión a célula.

**[0059]** Como alternativa, el conjugado profarmacológico puede usarse para tratar  
15 a un sujeto que lo necesita y puede usarse en un método *in vivo* para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto una población o tejido celular, que supuestamente contiene células procedentes de dicha población celular seleccionada, con una cantidad citotóxica de un agente citotóxico que comprende uno o más de los profármacos descritos  
20 anteriormente unidos a un agente de unión a célula.

**[0060]** El agente citotóxico se prepara como se ha descrito anteriormente.

**[0061]** Se conocen bien los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados y como garantía del estado clínico un experto en la materia puede determinarlo.

25 **[0062]** Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humana, (2) solución salina al 0,9% (NaCl al 0,9% p/v) y (3) dextrosa al 5% (p/v).

**[0063]** Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de cultivos celulares  
30 para destruir todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana o para destruir variantes que expresan el antígeno no deseado.

**[0064]** Un experto en la materia determina fácilmente las condiciones de uso no clínico *in vitro*.

**[0065]** Los ejemplos de usos *ex vivo* incluyen tratamientos de médula ósea  
35 autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células

enfermas o malignas: tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir células T competentes y prevenir la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD).

**[0066]** El tratamiento clínico *ex vivo* para eliminar células tumorales o células linfoides procedentes de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento contra el cáncer o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o para eliminar células T y otras células linfoides procedentes de tejido o de médula ósea alogénica antes del trasplante para prevenir la GVHD, puede realizarse de la siguiente manera. Se cultiva médula ósea procedente del paciente u otro individuo y después se incuba en un medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención, intervalos de concentración de aproximadamente 10  $\mu$ M a 1 pM, durante aproximadamente de 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Un experto en la materia determina fácilmente las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación (= dosis). Después de la incubación las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y regresan al paciente por infusión i.v. de acuerdo con métodos conocidos. En las circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tales como un ciclo de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo entre el tiempo de cultivo de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando un equipo médico convencional.

**[0067]** Para el uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se proporcionará como soluciones que se ensayan para determinar la esterilidad y niveles de endotoxina o como un sólido liofilizado que puede redisolverse en agua estéril para inyección. A continuación se indican ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugados. Los conjugados se proporcionan semanalmente durante 6 semanas como un bolo i.v. Las dosis emboladas se proporcionan en 50 a 400 ml de solución salina normal a la que puede añadirse albúmina de suero humana (por ejemplo de 0,5 a 1 ml de una solución concentrada de albúmina de suero humana, 100 mg/ml). Las dosificaciones serán de aproximadamente 50  $\mu$ g a 10 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (intervalo de 10  $\mu$ g a 100 mg/ml por inyección). Seis semanas después del tratamiento, el paciente puede recibir un segundo ciclo de tratamiento. Como garantía del estado clínico un experto en la materia puede determinar los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc.

**[0068]** Los ejemplos de estados médicos que pueden tratarse de acuerdo con los métodos *in vivo* o *ex vivo* de destrucción de poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidades de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer de pulmón, de mama, de colon, de próstata, de riñón, de páncreas, de ovario y de órganos  
5 linfáticos; melanomas; enfermedades autoinmunes tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injerto, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de hígado, rechazo del trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de corazón y rechazo de trasplante de médula ósea; la enfermedad de injerto contra hospedador; infecciones virales tales como  
10 infección por CMV, infección por VIH, SIDA; infecciones bacterianas e infecciones parasitarias, tales como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis.

#### EJEMPLOS

**[0069]** A menos que se indique otra cosa, todos los porcentajes, proporciones,  
15 partes, etc. son en peso.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

**[0070]** Los puntos de fusión se midieron usando un aparato Electrotérmico y están sin corregir. El espectro de RMN se registró en un espectrómetro Bruker  
20 AVANCE400 (400 MHz). Como patrón interno, los desplazamientos químicos se expresan en ppm respecto del TMS. Los espectros de masas se obtuvieron un sistema Bruker Esquire 3000. El espectro ultravioleta se registró en un espectrofotómetro Hitachi U1200. La HPLC se realizó usando un sistema Beckman Coulter GOLD 125 equipado con un detector de longitud de onda variable Beckman  
25 Coulter system GOLD 168 variable y un Waters RADIALPARK, (una columna C-18 de fase inversa). La cromatografía de capa fina se realizó en placas TLC de gel de sílice Analtech GF. El gel de sílice para la cromatografía en columna ultrarrápida fue de Baker. El tetrahidrofurano se secó por destilación sobre metal de sodio. La dimetilactamida y la dimetilformamida se secaron por destilación sobre hidruro de calcio a presión reducida. El resto de disolventes usados fueron de calidad reactiva  
30 o de calidad HPLC.

**[0071]** En la presente memoria se describe la síntesis de profármacos DC2 (**2**), DC3 (**3**) y DC4 (**4**) DC5 DC6 DC7 DC8 (**FIGS. 2-6**). DC2, DC3 y DC4 derivan del fármaco parental DC1, mientras que DC6, DC7 y CD8 pueden prepararse a partir  
35 del fármaco parental pegilado DC5. Los profármacos DC2 y DC3 son muy estables

en soluciones acuosas y pueden transformarse en el fármaco parental DC1 por incubación en suero, plasma o con una enzima tal como carboxilesterasa. Estos fármacos también tienen hidrosolubilidad aumentada en comparación con DC1. El profármaco DC4 también es soluble y muy estable en soluciones acuosas. La incubación de DC4 con fosfatasa alcalina lo transforma en el fármaco parental DC1.

**[0072]** En la fig. 4 se muestra el esquema sintético para la transformación de DC1 (1) a los profármacos DC2 (2) y DC3 (3). El sustituyente fenólico en DC1 puede reaccionar con cualquiera de los agentes indicados en la FIG. 3 para dar el intermedio 5. La reacción de 5 con N-metilpiperazina proporciona DC2. La reacción de 5 con 4-piperidino-piperidina proporciona DC3.

**[0073]** DC1 se transformó al profármaco DC4 como se muestra en la FIG. 6. El tratamiento DC1-SMe con dibencilfosfato y tetracloruro de carbono en presencia de base proporcionó el intermedio **4c**, mientras que la reacción de DC1-SMe con oxiclóruo fosforoso proporciona el intermedio **4b**. La eliminación de los grupos de protección bencilo de **4c** con hidrógeno, con reducción concomitante del enlace disulfuro proporciona DC4. La reducción de intermedio **4b** con TCEP o DTT proporciona DC4.

#### EJEMPLO I

**Preparación de** (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-metilpiperazino)carboniloxi]-3*H*-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1*H*-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1*H* indolo-2-carboxamida (DC2-SMe, 2b)

**[0074]** A una solución de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-hidroxi-3*H*-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1*H*-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1*H*-indolo-2-carboxamida (DC1SMe) DC1-SMe (**1b**, 40 mg, 0,058 mmol) en THF (4 ml) se le añadieron cloroformiato de 4-nitrofenilo (17 mg, 0,084 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA, 15 µl). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de argón durante 3 h. El análisis por TLC mostró que todo el DC1 se había consumido para formar un intermedio con un valor R<sub>f</sub> de 0,45 (fase móvil de 1:2 de acetona/tolueno). La mezcla de reacción se trató con 4-metilpiperazina (8,3 mg, 0,084 mmol) y después se agitó durante una noche en una atmósfera de argón. Después, la mezcla se diluyó con una mezcla 1:1 (v/v) de EtOAc/THF (15 ml) y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> acuoso 1 M, pH 5,0 (5 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc/THF (1:1,4 x 15 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron, se evaporaron, se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetona/tolueno, (3:8) y se recrystalizaron con THF/EtOAc/Hexano para proporcionar 40 mg (rendimiento del 85%) de DC2-SMe

(2b). R<sub>f</sub> = 0,31 (acetona/tolueno, 3:8); p.f. = 225°C (desc.); <sup>1</sup>H RMN (DMF-d<sub>7</sub>) 11,78 (s, 1H), 11,70 (s, 1H), 10,27 (s, 1H), 10,03 (s, 1H), 8,42 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 8,38 (s, 1H), 8,22 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 8,12 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,97 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,72 (dd, 1H, J = 1,9, 8,8 Hz), 7,65 (dt, 1H, J = 1,1, 7,0 + 7,0 Hz), 7,60 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,54 (t, 2H, J = 7,4 + 8,6 Hz), 7,48 (d, 1H, J = 1,4 Hz), 7,44 (dd, 1H, J = 1,9, 8,8 Hz), 7,36 (d, 1H, J = 1,6 Hz), 5,01 (t, 1H, J = 10,0 Hz), 4,84 (dd, 1H, J = 2,2, 10,9 Hz), 4,49 (m, 2H), 4,21 (dd, 1H, J = 3,2, 11,3 Hz), 4,10 (m, 2H), 3,82 (m, 2H), 3,22 (m, 2H), 3,13 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 2,96 (m, 2H), 2,87 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,50 (s, 3H), 2,31 (s, 3H); <sup>13</sup>C RMN 169,52, 161,13, 160,41, 153,73, 148,70, 142,72, 134,67, 134,49, 133,67, 133,36, 133,15, 132,16, 130,64, 128,41, 128,33, 128,22, 125,66, 125,59, 124,06, 123,10, 122,92, 119,97, 118,31, 113,49, 112,93, 112,90, 112,11, 111,66, 108,04, 106,98, 106,76, 103,80, 67,90, 67,65, 61,79, 55,82, 48,15, 42,68, 37,01, 34,56, 34,32, 23,36; MS m/z<sup>+</sup> 831,14 (M + Na)<sup>+</sup>, 833,13, 832,15, 847,14 (M+K)<sup>+</sup>, 849,14, 848,14; MS m/z<sup>-</sup> 807,30 (M-H)<sup>-</sup>, 808,25, 809,26, 810,23.

#### 15 EJEMPLO II

**Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-metilpiperazino)carboniloxi]-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercapto-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida (DC2, **2a**).**

**[0075]** Una solución de clorhidrato de *tris*-(2-carboxietilfosfina) (TCEP, 30 mg, 0,104 mmol) en H<sub>2</sub>O (2 ml) se ajustó a pH 7,0 con NaHCO<sub>3</sub> en polvo. A la solución se le añadieron 25 mg (0,031 mmol) de DC2-SMe (2b) en DMA (3 ml). Después de agitar durante 2 h, el pH se ajustó entre 3 - 4 mediante la adición de unas gotas de HOAc. La mezcla se concentró y se purificó usando TLC preparativa sobre gel de sílice, eluyendo con acetona/tolueno, 1:2) para producir 21 mg (90%) de DC2 (**2a**). <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) 10,91 (a, 2H), 10,81 (a, 1H), 9,56 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,15 (m, 1H), 8,02 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,94 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 7,63 - 7,55 (m, 3H), 7,47 (m, 1H), 7,36 (dd, 1H, J = 2,1, 8,8 Hz), 7,29 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 5,44 (dd, 1H, J = 2,0, 5,9 Hz), 4,85 (m, 2H), 4,40 (m, 2H), 4,10 (dd, 1H, J = 3,2, 11,2 Hz), 3,92 (dd, 1H, J = 7,8, 11,3 Hz), 3,81 (m, 2H), 3,22 (m, 2H), 3,08 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 2,87 (m, 2H), 2,82 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,38 (s, 3H); MS m/z<sup>+</sup> 785,22 (M<sup>+</sup>Na), 786,20, 787,20, 801,14 (M+K), 803,16 (M+2+K); MS m/z<sup>-</sup> 762,10 (M-H), 764,05, 763,08.

#### EJEMPLO III

**Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxi]-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida (DC3-SM2, **3b**). (**3b**) (DC3-SMe).**

**[0076]** A una solución de DC1-SMe, **1b**, (50 mg, 0,073 mmol) en THF (4 ml) se le añadieron cloroformiato de 4-nitrofenilo (35 mg, 0,173 mmol) y DIPEA (50  $\mu$ l). Después de agitar en una atmósfera de argón durante 3 h, el análisis por TLC mostró que todo el DC1-SMe se había consumido para dar un intermedio con R<sub>f</sub> = 0,45, 1:2 acetona/tolueno). La mezcla de reacción se trató con 4-piperidino-  
 5 piperidina (40 mg, 0,21 mmol), dando como resultado la formación de un precipitado pesado. La mezcla se dejó en agitación durante 4 h, se diluyó con 20 ml de EtOAc/THF (1:1) y 5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, pH 4,5. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc/THF (1:1, 4 x 15 ml). Las capas orgánicas se  
 10 combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron, se evaporaron, se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice (acetona/tolueno, 3:8) y se cristalizaron con THF/EtOAc/Hexano para proporcionar DC3-SMe (**3b**, 45 mg, rendimiento del 70%), p.f. = 285°C (desc.); [ $\alpha$ ] 29,7° (c 0,5 en DMF); <sup>1</sup>H RMN 11,93 (s, 1H), 11,76 (s, 1H), 10,44 (s, 1H), 10,09 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, J = 8,3  
 15 Hz), 8,00 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,79 (dd, 1H, J = 1,4,8,6 Hz), 7,65 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,61 - 7,52 (m, 3H), 7,47 - 7,44 (m, 2H), 7,35 (d, 1H, J = 1,0 Hz), 5,00 (t, 1H, J = 10,0 Hz), 4,83 (dd, 1H, J = 1,2, 10,2 Hz), 4,67 (m, 1H), 4,51 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,21 (dd, 1H, J = 3,1, 11,1 Hz), 4,11 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 3,12 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 3,10 (m, 2H), 2,95 (m, 1H), 2,87 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,49 (s, 3H), 2,39 (m, 2H), 2,12  
 20 (m, 2H), 2,02 - 1,60 (m, 10H); <sup>13</sup>C RMN 169,52, 162,90, 161,15, 160,34, 153,55, 148,47, 142,66, 134,66, 134,48, 133,76, 133,35, 133,29, 132,08, 130,63, 128,37, 128,22, 125,69, 125,52, 123,47, 123,11, 120,01, 118,01, 113,43, 112,89, 112,08, 111,72, 63,44, 60,08, 56,01, 50,00, 48,08, 42,62, 37,01, 34,07, 24,10, 24,08, 23,08, 22,78; MS m/z+ 878,24 (M + H)<sup>+</sup>, 880,24, 879,25, 880,24; MS m/z- 876,40 (M-H)<sup>-</sup>,  
 25 878,34, 877,37, 879,35.

#### EJEMPLO IV

**Preparación de (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-5-[(4-piperidino-piperidino)carbonilo]-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil)-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercaptopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida (DC3, **3a**). (**3a**) (**DC3**).**

**[0077]** Una solución de TCEP (15,2 mg, 0,053 mmol) en H<sub>2</sub>O (0,7 ml) se ajustó a pH 7,0 mediante la adición de 13,5 mg de NaHCO<sub>3</sub> en polvo. A la solución se le añadió DC3-SMe (**3b**, 8,2 mg, 0,0093 mmol) en DMA (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h. Después, se añadieron unas gotas de HOAc para ajustar el pH entre 3-4. La mezcla se concentró y se purificó usando TLC preparativa sobre gel de sílice, eluyendo con acetona/tolueno, (1:2) para producir 7 mg de DC3 (**3a**). MS  
 35 m/z+ 854,31 (M+Na)<sup>+</sup>, 855,31, 856,32, 857,31.

## EJEMPLO V

**Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-(fosfonoxi)-3*H*-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1*H*-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1*H*-indolo-2-carboxamida (**4b**) (DC4-SMe)**

- 5 **[0078]** Una solución de DC1-SMe (**1b**, 50 mg, 0,073 mmol) en una mezcla de THF (5 ml), CH<sub>3</sub>CN (4 ml) y DMA (0,5 ml) se agitó en una atmósfera de argón. A la mezcla se le añadieron secuencialmente POCl<sub>3</sub> (80 µl), DIPEA (150 µl) y DMAP (3 mg). Después de agitar durante 2 h, los análisis por TLC y HPLC mostraron que el DC1-SMe se había consumido completamente. Se añadió NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> acuoso 1,0 M,
- 10 pH 4,0 (2 ml) y la mezcla se agitó durante una noche. La mezcla se acidificó adicionalmente con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a pH 2,0, se saturó con NaCl y se extrajo con THF/EtOAc (1:1, 6 x 15 ml). La capa orgánica se separó, se concentró y el residuo se recrystalizó con THF/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH para proporcionar 47 mg (84%) del compuesto del título (DC4-SMe). <sup>1</sup>H RMN (DMF-d<sub>7</sub>) 11,77 (s, 1H), 11,70 (s, 1H), 10,26 (s, 1H),
- 15 10,02 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,30 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 8,22 (s, 1H), 7,72 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,59 (m, 2H), 7,55 - 7,43 (m, 4H), 7,33 (s, 1H), 4,96 (t, 1H, J = 9,8 Hz), 4,81 (d, 1H, J = 10,2 Hz), 4,42 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,05 (dd, 1H, J = 7,8, 11,0 Hz), 3,11 (t, 2H, J = 7,0 Hz), 2,87 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,49 (s, 3H); <sup>13</sup>C RMN 169,96, 161,45, 160,85, 143,10, 135,12, 134,93, 134,15, 133,81, 133,58, 132,80,
- 20 131,60, 128,86, 128,78, 128,02, 124,50, 124,05, 120,22, 118,61, 113,97, 113,40, 113,32, 112,57, 108,02, 104,27, 56,18, 48,60, 43,21, 37,47, 34,49, 23,53; <sup>31</sup>P RMN - 3,37; MS m/z 762,77 (M-H)<sup>-</sup>, 764,80, 763,76.

## EJEMPLO VI

**Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-(fosfonoxi)-3*H*-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1*H*-indol-5-il]-5-[(3-mercapto-1-oxopropil)-amino]-1*H*-indolo-2-carboxamida (**4a**) (DC4)**

- 25 **[0079]** Una solución de TCEP (30 mg, 0,104 mmol) en 2 ml de H<sub>2</sub>O se ajustó a pH 6,5 - 7,0 mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub> en polvo. A la solución se le añadió DC4-SMe (26 mg, 0,034 mmol) en 3 ml de DMA/H<sub>2</sub>O (1:1). Después de que se agitara
- 30 durante 2 h en una atmósfera de argón, se añadieron unas gotas de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 10% para al alcanzar pH 2,0. Después, la mezcla se extrajo con DMA/EtOAc (1:5, 6 x 10 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se evaporaron y se purificaron por HPLC preparativa, usando una columna C18, 20 x 250 mm, caudal = 8,0 ml/min, fase móvil: A: HOAc al 0,01% en H<sub>2</sub>O, B: DMA al 2% en CH<sub>3</sub>CN; tabla de tiempos: 0 -
- 35 10', 5% de B; a 20', 20% de B; a 50': 50% de B. El pico DC4 se eluyó entre 30 - 38 min. Las fracciones que contenían DC4 se agruparon, se concentraron y se secaron al vacío para producir 22 mg (89%) del compuesto del título **4a**. <sup>1</sup>H RMN (DMF-d<sub>7</sub>)

11,76 (s, 1H), 11,69 (s, 1H), 10,26 (s, 1H), 10,02 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,29 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 8,21 (s, 1H), 7,79 (d, 1H, J = 5,1 Hz), 7,60 - 7,43 (m, 6H), 7,27 (s, 1H), 4,96 (t, 1H, J = 9,2 Hz), 4,80 (d, 1H, J = 10,6 Hz), 4,42 (m, 1H), 4,23 (dd, 1H, J = 2,2, 9,4 Hz), 4,06 (dd, 1H, J = 7,4, 10,6 Hz), 3,12 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,88 (t, 2H, J = 7,1 Hz); MS m/z 716,16 (M-H)<sup>+</sup>, 717,12, 718,12.

**[0080]** Como alternativa, a una solución de DTT (20 mg) en una mezcla de acetona (3 ml) y tampón de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (3 ml), pH 7,0 se le añadió DC4SMe (22 mg, 0,028 mmol). Después de agitar en una atmósfera de argón durante 4 h, se añadieron unas gotas de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5% a pH 3,0. La mezcla se concentró y se purificó sobre una columna C18 (1,0 x 12 cm) eluyendo con agua al 100% a agua en acetona al 50%. Las fracciones se agruparon y se evaporaron a sequedad para proporcionar 18 mg (90%) de DC4 (4a). MS m/z- 716,30, 718,30, 717,30.

#### EJEMPLO VII

**Preparación de (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-(dibencilfosfonoxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida (4c) (dibencilfosfato de DC4-SMe)**

**[0081]** A una solución de DC1-SMe (50 mg, 0,073 mmol) en 10 ml de THF/CH<sub>3</sub>CN (1:1) en una atmósfera de argón se le añadieron secuencialmente CCl<sub>4</sub> (100 µl, 1,036 mmol), DIPEA (55 µl, 0,316 mmol), dibencilfosfito (100 µl, 0,452 mmol) y DMAP (0,2 mg, 0,0016 mmol). Después de agitar durante una noche en una atmósfera de argón, la reacción parecía haberse completado según se determinó mediante análisis por TLC, con la formación de un nuevo producto con un R<sub>f</sub> = 0,37 en 1:2 de acetona/tolueno). La mezcla se diluyó con 5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M, pH 4,0, y EtOAc (10 ml). La capa orgánica se separó y la solución acuosa se extrajo con THF/EtOAc (1:1,4 x 15 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron, se evaporaron y se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con acetona/tolueno (3:7), para proporcionar 62 mg (89%) del compuesto del título 4c. <sup>1</sup>H RMN (DMF-d<sub>7</sub>) 11,84 (s, 1H), 11,74 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 10,04 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 8,10 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 7,74 (dd, 1H, J = 1,7, 8,8 Hz), 7,66 - 7,61 (m, 2H), 7,55 - 7,29 (m, 15H), 5,37 (t, 4H, J = 7,5 Hz), 5,01 (m, 2H), 4,84 (dd, 1H, J = 1,9, 10,9 Hz), 4,51 (m, 1H), 4,20 (dd, 1H, J = 3,2, 10,9 Hz), 4,11 (dd, 1H, J = 6,9, 11,1 Hz), 3,13 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,87 (t, 2H, J = 7,1 Hz), 2,50 (s, 3H); <sup>13</sup>C RMN 169,52, 161,18, 160,41, 147,88, 147,20, 136,74, 136,67, 134,68, 134,56, 133,70, 133,36, 133,20, 132,11, 130,83, 129,25, 129,23, 129,21, 129,19, 128,84, 128,78, 128,62, 128,42, 128,32, 127,90, 124,28, 124,22, 123,96, 123,33, 122,87, 120,03, 118,32, 113,51, 112,94, 112,12,

108,42, 106,87, 70,75, 70,69, 67,91, 55,90, 47,96, 42,59, 37,02, 34,04, 23,08;  $^{31}\text{P}$  RMN -4,49; MS m/z 966,17 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^{+}$ , 968,14 ( $\text{M} + 2 + \text{Na}$ ), 967,17.

#### Conversión en DC4:

- 5 **[0082]** Un matraz se cargó con **4c** (20 mg, 0,021 mmol) y se trató con Pd/C (15 mg), ácido acético glacial (100  $\text{O}$ l) y DMA (4 ml). El sistema se evacuó con succión al vacío y después se agitó en una atmósfera de hidrógeno a través de un globo cargado con hidrógeno durante una noche. El catalizador se retiró por filtración, el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por HPLC preparativa como se ha
- 10 descrito anteriormente para producir 6 mg (39%) de DC4 (**4a**). MS m/z 716,48 ( $\text{M} - \text{H}$ ) $^{-}$ , 717,48, 718,50.

#### EJEMPLO VIII

**Preparación de** (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-hidroxi-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-nitro-1H-indolo-2-carboxamida (DC0, **10a**).

- 15 **[0083]** A una solución de 5-hidroxi-3-amino-1-[S]-(clorometil)-1,2-dihidro-3H-benzo(e)indol, sal clorhidrato [seco(-) CBI, 20 mg, 0,72 mmol] y ácido 5-[5'-nitroindol-2'-il-carbonil-amino]indolo-2-carboxílico (**9**, 25 mg, 0,068 mmol) en DMA (3 ml) se le añadió EDC (40 mg, 0,20 mmol) en una atmósfera de argón. Después de agitar durante una noche, se añadieron unas gotas de HOAc al 50% y la mezcla
- 20 se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía TLC preparativa sobre gel de sílice (acetona al 40% en tolueno) para proporcionar 25 mg de DCO (**10a**).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMF-d}_7$ ) 12,54 (s, 1H), 11,73 (s, 1H), 10,60 (s, 1H), 10,58 (s, 1H), 8,80 (d, 1H, J = 2,3 Hz), 8,42 (d, 1H, J = 1,9 Hz), 8,25 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 8,19 (dd, 1H, J = 2,1, 9,1 Hz), 8,09 (a, 1H), 7,95 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 7,82 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,79 (d,
- 25 1H, J = 9,1 Hz), 7,74 (dd, 1H, J = 2,0, 8,9 Hz), 7,62 (d, 1H, J = 8,8 Hz), 7,58 (dt, 1H, J = 1,7, 7,0 + 7,0 Hz), 7,42 (dt, 1H, J = 1,2, 7,0 + 7,0 Hz), 7,33 (d, 1H, J = 1,7 Hz), 4,91 (t, 1H, J = 11,0 Hz), 4,77 (dd, 1H, J = 2,1, 11,1 Hz), 4,33 (m, 1H), 4,13 (dd, 1H, J = 3,1, 11,1 Hz), 3,97 (dd, 1H, J = 7,9, 11,1 Hz);  $^{13}\text{C}$  RMN 163,35, 161,48, 160,05, 155,79, 142,98, 137,18, 135,03, 133,22, 133,16, 131,50, 128,85, 128,45, 128,11,
- 30 124,62, 124,02, 123,76, 120,33, 119,36, 118,70, 116,45, 114,00, 113,08, 106,97, 105,02, 101,53; MS m/z 602,96 ( $\text{M} + \text{Na}$ ) $^{+}$ , 604,78, 603,81, 618,64 ( $\text{M} + \text{K}$ ) $^{+}$ , 620,48.

#### EJEMPLO IX

**Preparación de** (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-hidroxi-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-

- 35 carboxamida, DC1SMe (**1b**)

**[0084]** Un matraz se cargó con **10a** (10 mg, 0,017 mmol), Pd/C (10 mg), HCl (conc. 3  $\mu\text{l}$ ) y DMA (2,5 ml). Después de que se evacuara el aire, se canalizó

hidrógeno mediante un globo de hidrógeno durante una noche. El catalizador se retiró por filtración y el disolvente se evaporó para dar 10b en forma de un sólido de color pardo. El compuesto sólido se usó directamente sin purificación adicional.

**[0085]** A **10b** en DMA (2 ml) se le añadieron ácido 3-(metilditio)propiónico (5 mg, 0,032 mmol) y EDC (15 mg, 0,078 mmol) en una atmósfera de argón. Después de agitar durante una noche, se añadieron dos gotas de HOAc al 50% y la mezcla se evaporó a sequedad y se purificó por TLC preparativa sobre gel de sílice (40% acetona en tolueno) para proporcionar 6 mg de DC1-SMe (**1b**)  $R_f = 0,40$  (3:7 acetona/tolueno);  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) 10,91 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 9,64 (s, 1H), 9,56 (s, 1H), 9,27 (s, 1H), 8,35 (d, 1H,  $J = 1,9$  Hz), 8,25 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz), 8,17 (d, 1H,  $J = 1,9$  Hz), 8,07 (s, 1H), 7,88 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz), 7,64 (dd, 1H,  $J = 2,0, 8,1$  Hz), 7,58 - 7,50 (m, 3H), 7,38 - 7,35 (m, 2H), 7,31 (d, 1H,  $J = 1,7$  Hz), 7,26 (d, 1H,  $J = 1,7$  Hz), 4,86 (dd, 1H,  $J = 8,7, 11,0$  Hz), 4,80 (dd, 1H,  $J = 2,3, 10,9$  Hz), 4,30 (m, 1H), 4,07 (dd, 1H,  $J = 3,1, 11,0$  Hz), 3,83 (dd, 1H,  $J = 8,4, 11,2$  Hz), 3,09 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz), 2,83 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz), 2,45 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN 169,56, 161,10, 160,43, 155,13, 143,50, 134,78, 134,46, 133,55, 133,34, 133,03, 132,57, 131,21, 128,80, 128,69, 128,21, 124,22, 124,02, 123,53, 123,44, 120,16, 118,79, 116,45, 113,91, 113,02, 112,95, 112,73, 106,78, 103,72, 101,63, 56,01, 47,73, 43,10, 37,25, 34,01, 23,00; MS  $m/z$  706,71 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , 708,58, 707,71, 722,34 ( $\text{M} + \text{K}$ ) $^+$ , 724,42.

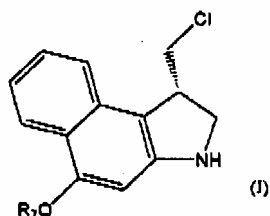
## 20 EJEMPLO X

**Preparación de** (S)-N-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-hidroxi-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(15"-metilditio-4",7",10",13"-tetraoxapentadecil-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida (**DC5-SMe**)

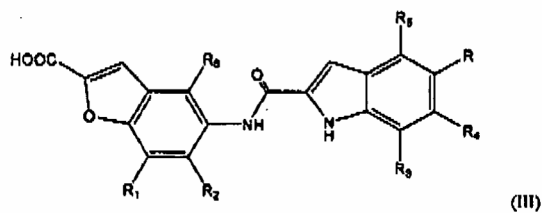
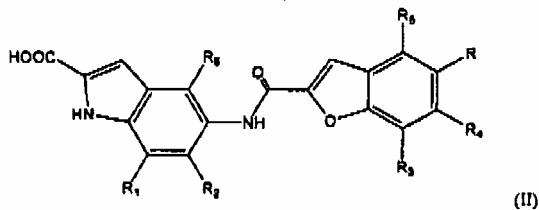
**[0086]** A una solución de **10b** (50 mg, 0,091 mmol) en DMA (5 ml) se le añadieron ácido 15"-metilditio-4",7",10",13"-tetraoxapentadecanoico (33 mg, 0,100 mmol) y EDC (88 mg, 0,459 mmol) en una atmósfera de Ar. Después de que se agitara durante una noche, a la mezcla se le añadieron dos gotas de HOAc al 50% y la mezcla se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (30% acetona en tolueno) para proporcionar DC5-SMe.

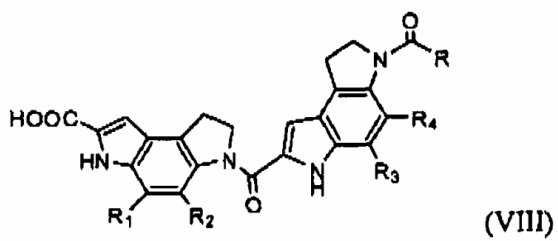
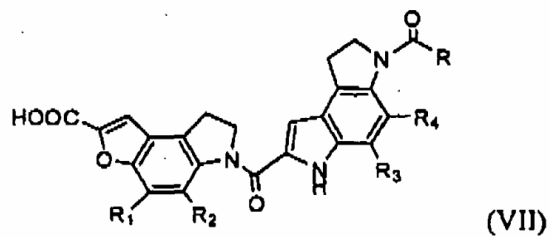
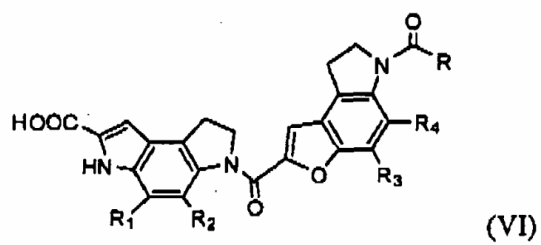
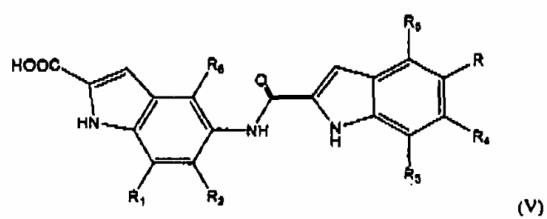
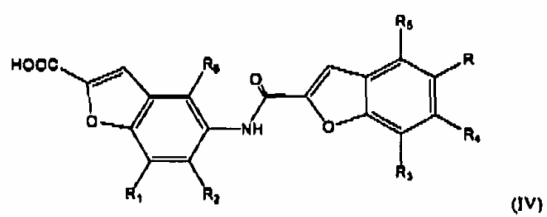
**REIVINDICACIONES**

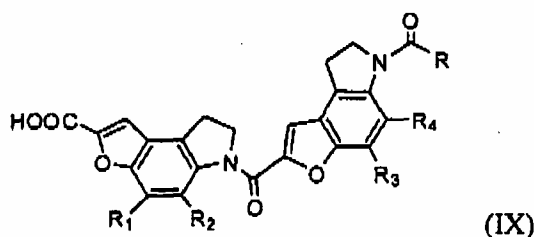
1. Un profármaco que comprende un análogo de un fármaco citotóxico que  
 5 contiene *seco-ciclopropabenzoindol* seleccionado entre el grupo que consiste  
 en análogos formados a partir de una primera subunidad de fórmula (I) unida  
 covalentemente a una segunda subunidad de la fórmula (II), (III), (IV), (V),  
 (VI), (VII), (VIII) o (IX) por medio de un enlace amida desde el grupo amino  
 10 secundario del resto pirrol de la primera subunidad con el carboxilo C-2 de la  
 segunda subunidad,  
 en el que la fórmula (I) es como se indica a continuación:



en el que las fórmulas (II) - (IX) son como se indica a continuación:







en las que R representa un enlazador capaz de conjugar dicho profármaco con un agente de unión a célula mediante un enlace disulfuro, un grupo inestable a ácido, un grupo inestable a la luz, un grupo inestable a peptidasa o un grupo inestable a esterasa; en las que cada uno de  $R_1$ - $R_6$  es independientemente hidrógeno, alquilo lineal  $C_1$ - $C_3$ , metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y en las que  $R_7$  se selecciona entre el grupo que consiste en un piperazino carbamato, un 4-piperidino-piperidino carbamato y un fosfato.

10

2. El profármaco de la reivindicación 1, en el que R es capaz de conjugar el profármaco con un agente de unión a célula mediante un enlace disulfuro.

15

3. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que  $R_1$ - $R_6$  son hidrógeno.

20

4. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R es capaz de conjugarse por medio de un enlace disulfuro y comprende un grupo tiol o un enlace disulfuro.

5. El profármaco de cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que R comprende polietilenglicol de la fórmula  $-(O(CH_2)_2)_n-$ , en la que n es un número entero de 2 a 1000.

25

6. El profármaco de la reivindicación 1, en el que R representa un enlazador capaz de conjugarse con una parte carbohidrato del agente de unión a célula por medio de un enlazador de hidrazona inestable a ácido y en el que R comprende un grupo hidrazido.

30

7. El profármaco de la reivindicación 1, en el que R representa un enlazador capaz de conjugarse con el agente de unión a célula por medio de un

enlazador inestable a ácido, un enlazador inestable a la luz o un espaciador peptídico y en el que R comprende un grupo amino.

8. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha  
5 segunda subunidad se representa por la fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX) y en el que R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> son hidrógeno.
9. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-[(4-metilpiperazino)carbonilo]oxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-  
10 5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
10. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-[(4-metilpiperazino)carbonilo]oxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-  
15 5-[(3-mercapto-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
11. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-[(4-piperidino-piperidino)carbonilo]oxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-  
20 indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
12. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-[(4-piperidino-piperidino)carbonilo]oxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-  
25 indol-5-il]-5-[(3-mercapto-1-oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
13. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-(fosfonoxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-  
30 oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
14. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-(fosfonoxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1H-indol-5-il]-5-[(3-mercapto-1-  
oxopropil)-amino]-1H-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.  
35
15. El profármaco de la reivindicación 8 que es (S)-N-[2-((1-clorometil)-1,2-dihidro-  
5-(fosfonoxi)-3H-benzo(e)indol-3-il]carbonil)-1H-indol-5-il]-5-[(15"-metilditio-

4",7",10",13"-tetraoxapentadecil-1-oxopropil)-amino]-1*R*-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.

- 5 16. (S)-*N*-[2-[(1-clorometil)-1,2-dihidro-5-(dibencilfosfonoxi)-3*H*-benzo(e)indol-3-il]carbonil]-1*H*-indol-5-il]-5-[(3-metilditio-1-oxopropil)-amino]-1*H*-indolo-2-carboxamida o una sal del mismo.
- 10 17. Un conjugado de profármaco que comprende un agente de unión a célula unido a uno o más de los profármacos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el agente de unión a célula es un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal que contiene al menos un sitio de unión o un anticuerpo monocatenario.
- 15 18. El conjugado de profármaco de la reivindicación 17 en el que dicho agente de unión a célula es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que contiene al menos un sitio de unión.
- 20 19. El conjugado de profármaco de la reivindicación 17 o de la reivindicación 18, en el que el conjugado comprende un profármaco como se ha definido en la reivindicación 7 unido a con el agente de unión a célula por medio de un espaciador peptídico.
- 25 20. Una composición que comprende el conjugado de profármaco de la reivindicación 17 o de la reivindicación 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 21. El conjugado de profármaco de la reivindicación 17 o de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesita.
- 35 22. Un método para inhibir el crecimiento de las poblaciones de células seleccionadas *in vitro* o *ex vivo* que comprende poner en contacto una población de células o un tejido que se supone que contiene células de dicha población de células seleccionadas con una cantidad citotóxica del conjugado de la reivindicación 17 o la reivindicación 18 o la composición de la reivindicación 20.

FIGURA 1

FIG. 1A

TÉCNICA ANTERIOR

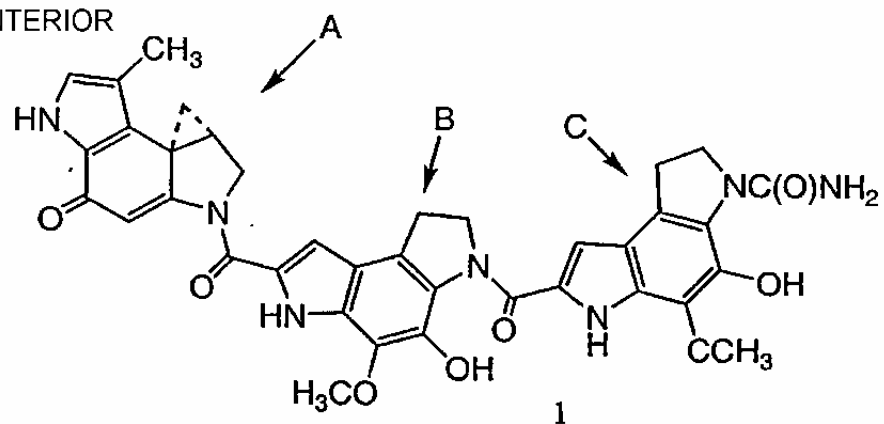


FIG. 1B

TÉCNICA ANTERIOR

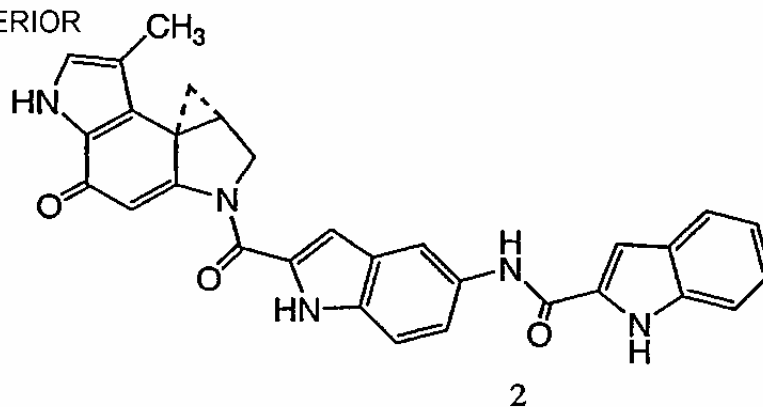


FIG. 1C

TÉCNICA ANTERIOR

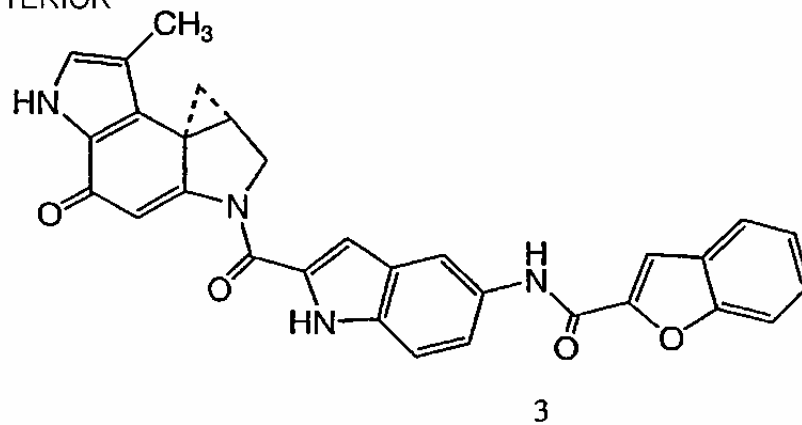
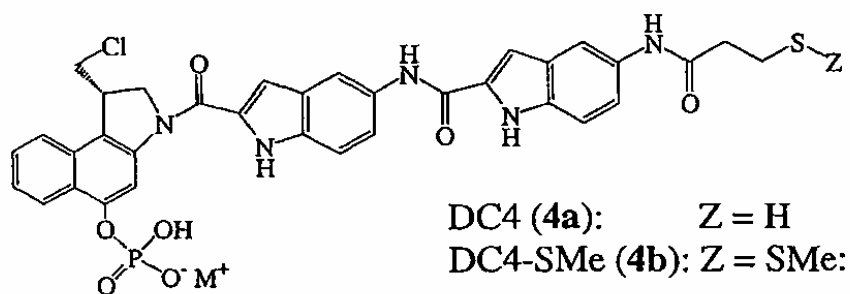
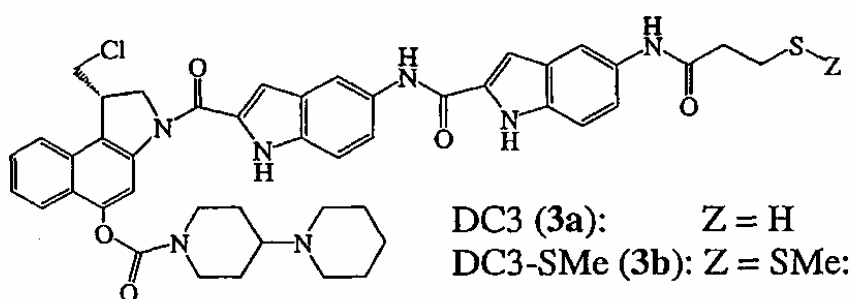
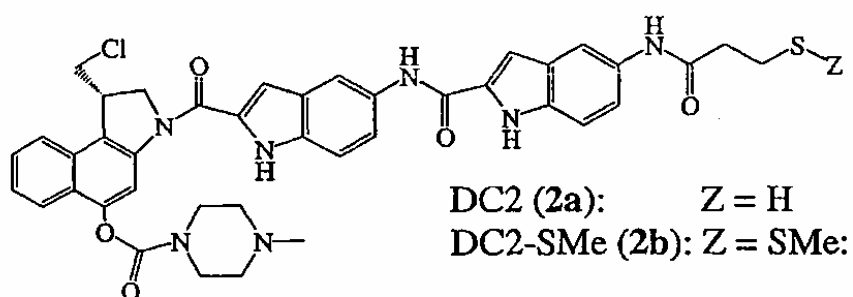
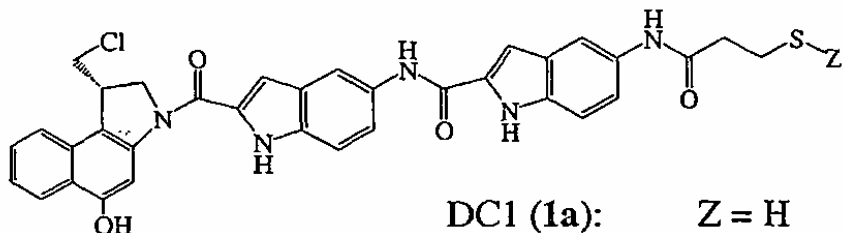


FIGURA 2



$M^+ = Na^+, K^+ \text{ etc}$

[illegible]

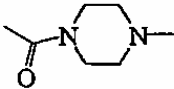
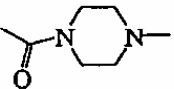
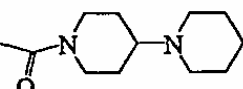
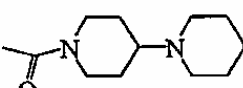
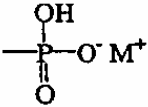
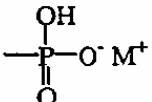
DC5 ( <b>5a</b> )	Z = H	R <sub>7</sub> = H
DC5-SMe ( <b>5b</b> )	Z = SMe	R <sub>7</sub> = H
DC6 ( <b>6a</b> )	Z = H	R <sub>7</sub> = 
DC6-SMe ( <b>6b</b> )	Z = SMe	R <sub>7</sub> = 
DC7 ( <b>7a</b> )	Z = H	R <sub>7</sub> = 
DC7-SMe ( <b>7b</b> )	Z = SMe	R <sub>7</sub> = 
DC8 ( <b>8a</b> )	Z = H	R <sub>7</sub> = 
DC8-SMe ( <b>8b</b> )	Z = SMe	R <sub>7</sub> =  M <sup>+</sup> = Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> etc

FIGURA 4A

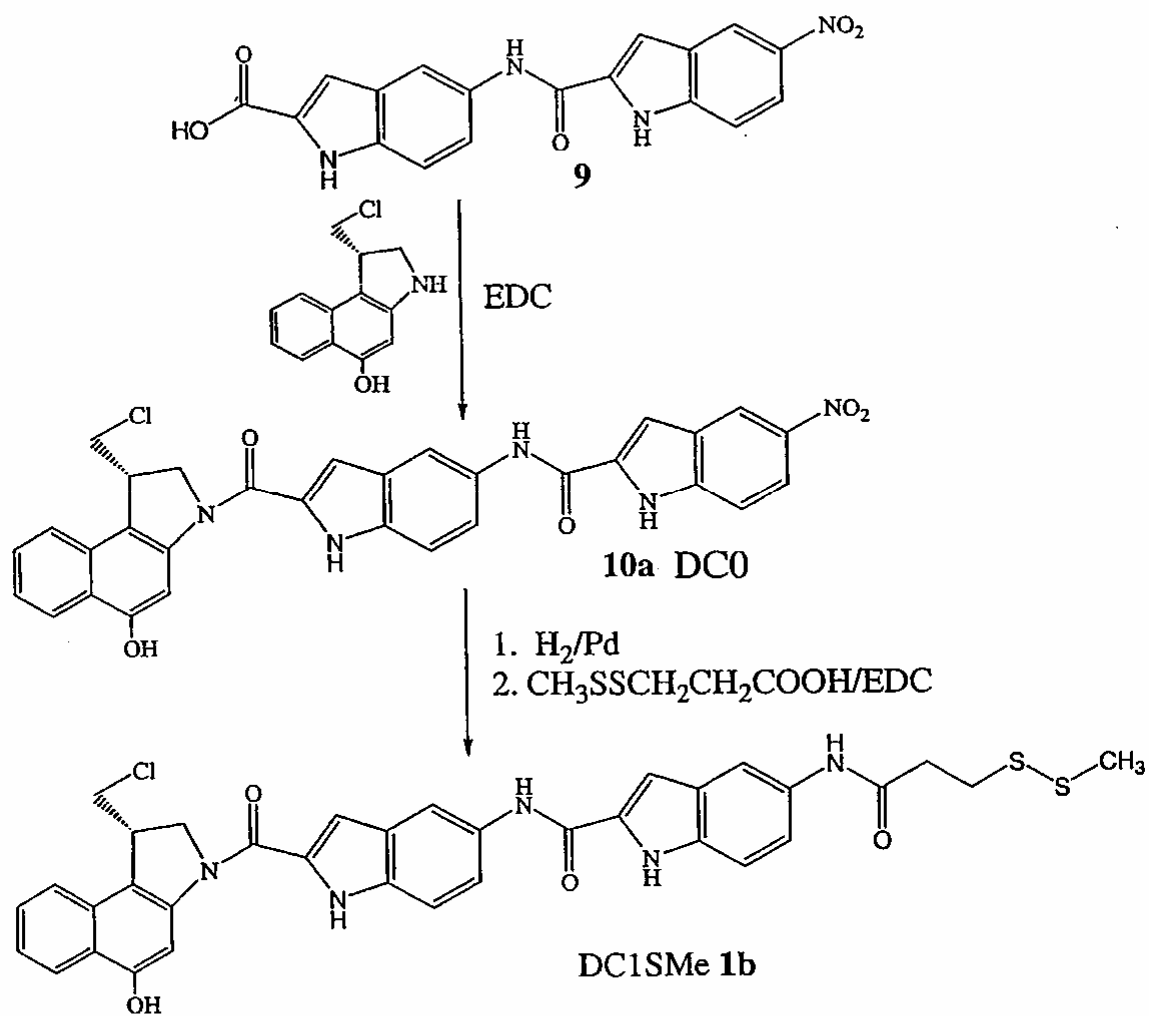


FIGURA 4B

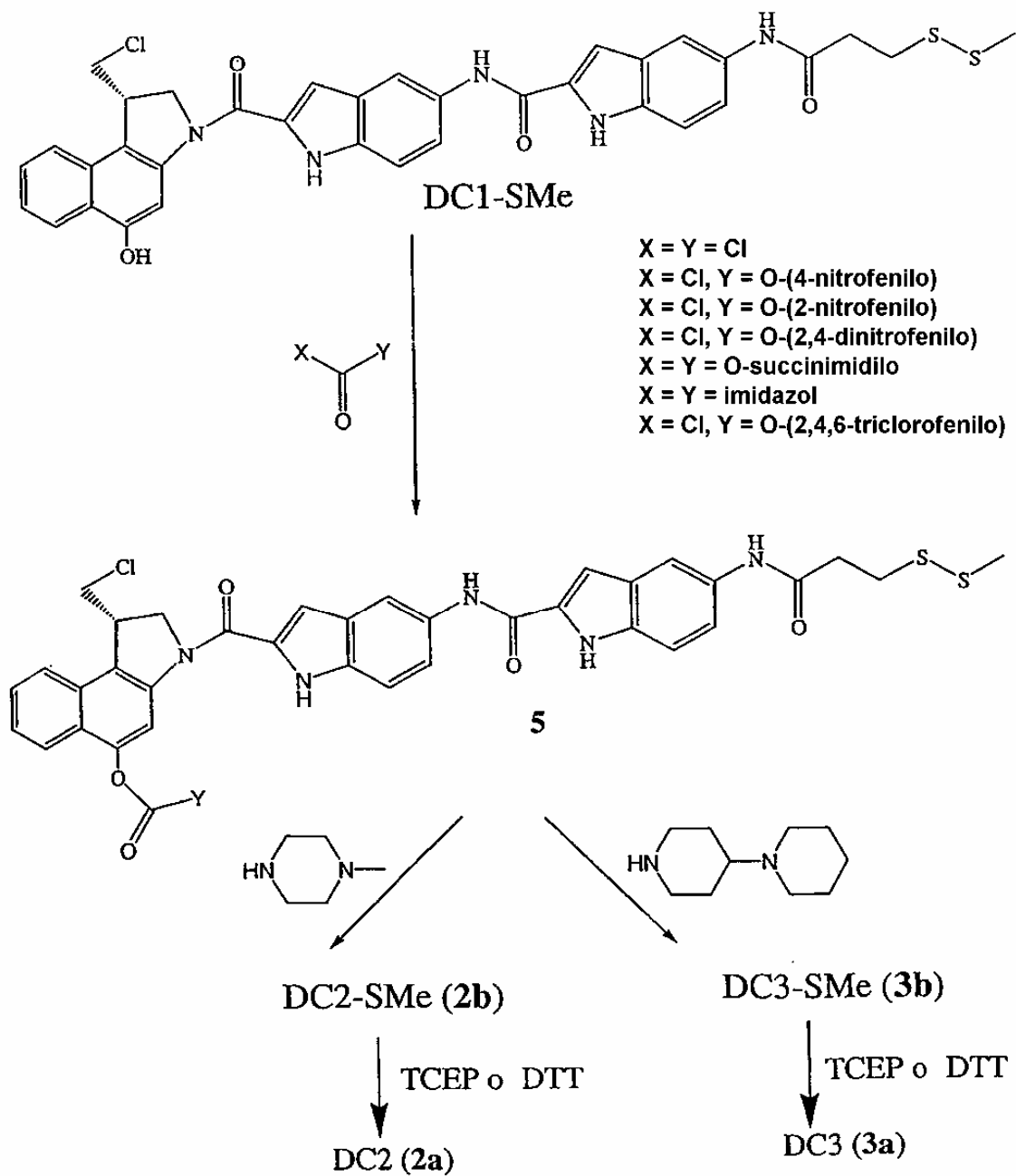


FIGURA 5

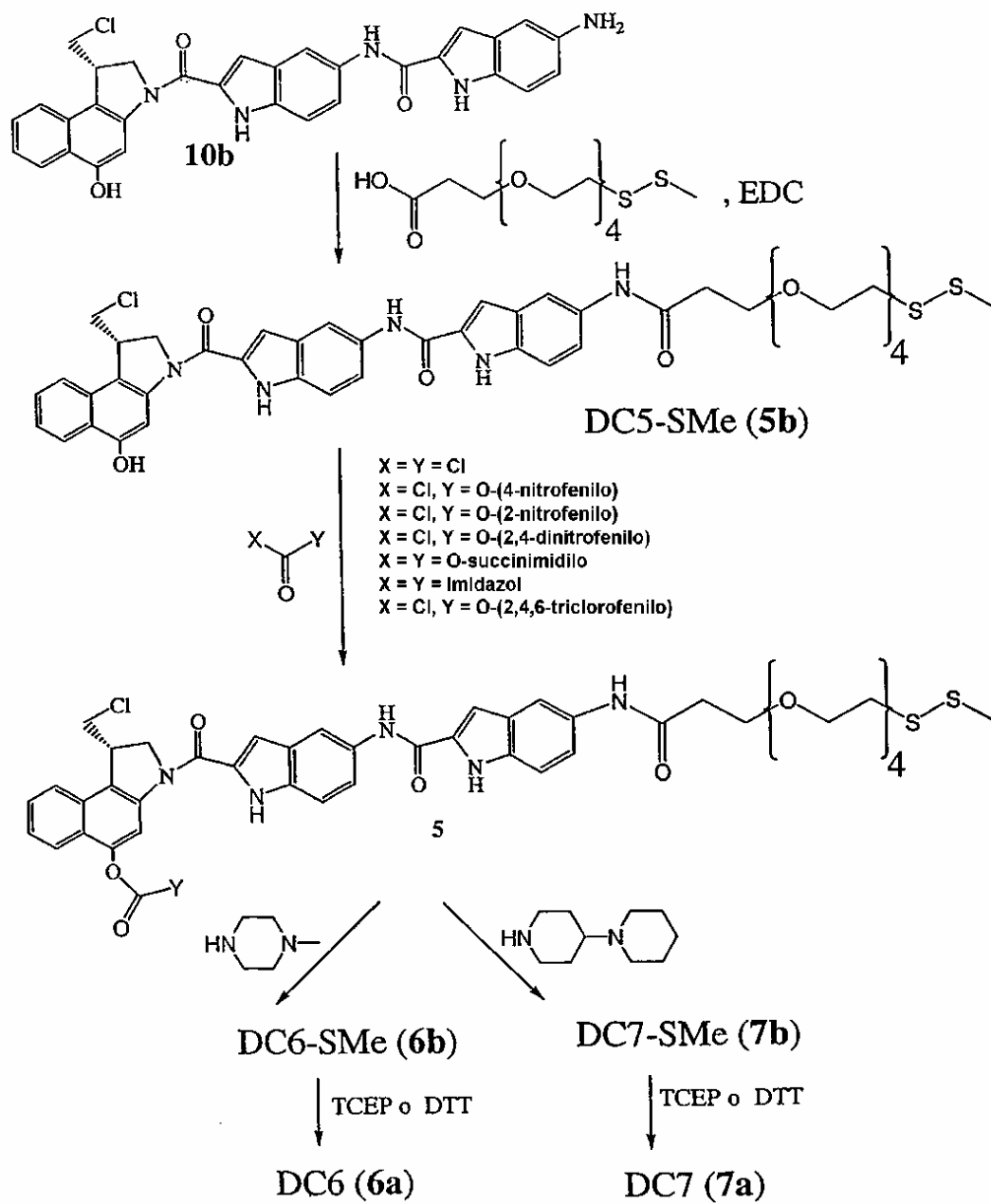
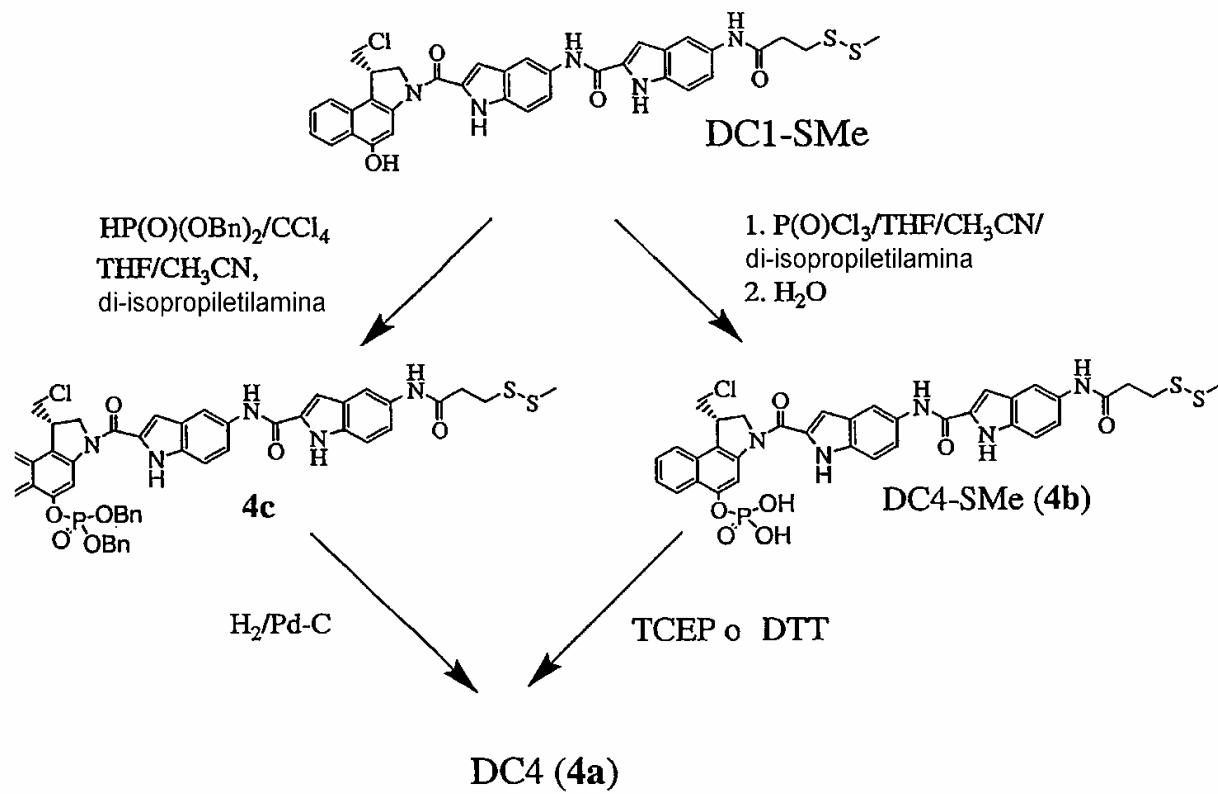


FIGURA 6



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tomado  
 5 especial cuidado en la compilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10 • US 5475092 A [0008] [0030]
- US 5585499 A [0008] [0055]
- US 5846545 A [0008] [0036]
- US 5646298 A [0013]
- US 5208020 A [0030]
- 15 • US 4542225 A [0049]
- US 4569789 A [0049]
- US 4618492 A [0049]
- US 4764368 A [0049]
- US 4625014 A [0051]

20

**Documentos citados en la descripción no pertenecientes a patentes**

- Sela et al. Immunoconjugates. 1987, 189-216 [0002]
- Ghose et al. Targeted Drugs. 1983, 1-22 [0002]
- 25 • Diener et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 1-23 [0002]
- Pietersz et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 25-53 [0002]
- Bumol et al. Antibody Mediated Delivery Systems. 1988, 55-79 [0002]
- G.A. Pietersz ; K.Krauer. J. Drug Targeting, 1994, vol. 2, 183-215 [0002]
- R. V. J. Chari. Adv. Drug Delivery Revs., 1998, vol. 31, 89-104 [0002]
- 30 • W.A. Blattler ; R.V.J. Chari. Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy. ACS Symposium Series 796, 317-338 [0002]
- Garnett et al. Cancer Res., 1986, vol. 46, 2407-2412 [0002]
- Ohkawa et al. Cancer Immunol. Immunother., 1986, vol. 23, 81-86 [0002]
- Endo et al. Cancer Res., 1980, vol. 47, 1076-1080 [0002]
- 35 • Hurwitz et al. Appl. Biochem., 1980, vol. 2, 25-35 [0002]
- Manabi et al. Biochem. Pharmacol., 1985, vol. 34, 289-291 [0002]
- Dillman et al. Cancer Res., 1986, vol. 46, 4886-4891 [0002]

- Shoval et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, vol. 85, 8276-8280 **[0002]**
- Tsukada et al. J. Natl. Canc. Inst., 1984, vol. 73, 721-729 **[0002]**
- Kato et al. J. Med. Chem., 1984, vol. 27, 1602-1607 **[0002]**
- Tsukada et al. Br. J. Cancer, 1985, vol. 52, 111-116 **[0002]**
- 5 • Lambert et al. J. Biol. Chem., 1985, 12035-12041 **[0003]**
- Lambert et al. Immunotoxins. 1988, 175-209 **[0003]**
- Ghetie et al. Cancer Res., 1988, vol. 48, 2610-2617 **[0003]**
- R. V. J. Chari et al. Cancer Res., 1992, vol. 52, 127-131 **[0003] [0030]**
- C. Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, vol. 93, 8618-8623 **[0003]**
- 10 • L.M. Hinman et al. Cancer Res., 1993, vol. 53, 3536-3542 **[0003]**
- P.R. Hamann et al. BioConjugate Chem., 2002, vol. 13, 40-46 **[0003]**
- B.K. Bhuyan et al. Cancer Res., 1982, vol. 42, 3532-3537 **[0004]**
- Martin, D. G. et al. J. Antibiotics, 1980, vol. 33, 902-903 **[0005]**
- Chidester, C. G. et al. J. Am. Chem. Soc., 1981, vol. 103, 7629-7635 **[0005]**
- 15 • Hurley, L. H. et al. Science, 1984, vol. 226, 843-844 **[0005]**
- V. L. Reynolds et al. J. Antibiotics, 1986, vol. XXIX, 319-334 **[0007]**
- M.A. Warpehoski et al. J. Med. Chem., 1988, vol. 31, 590-603 **[0007]**
- D.L. Boger et al. J. Org. Chem., 1990, vol. 55, 5823-5833 **[0007]**
- D.L. Boger et al. BioOrg. Med. Chem. Lett., 1991, vol. 1, 115-120 **[0007]**
- 20 • B.F. Foster et al. Investigational New Drugs, 1996, vol. 13, 321-326 **[0007]**
- I. Wolff et al. Clin. Cancer Res., 1996, vol. 2, 1717-1723 **[0007]**
- R.V. J. Chari et al. Cancer Res., 1995, vol. 55, 4079-4084 **[0008]**
- L.H. Li et al. Cancer Res., 1992, vol. 52, 4904-4913 **[0013]**
- A. Sparreboom. Clin. Cancer Res., 1998, vol. 4, 2747-2754 **[0014]**
- 25 • L.P. Rivory et al. Biochem Pharmacol., 1996, vol. 52, 1103-1111 **[0014]**
- S.Z. Fields et al. Clin. Cancer Res., 1995, vol. 1, 105-111 **[0015]**
- Boger et al. Synthesis, 1999, (SI), 1505-1509 **[0016]**
- R.V.J. Chari et al. Cancer Res., 1995, vol. 55, 4079-4084 **[0030]**
- Warpehoski et al. J. Med. Chem., 1998, vol. 31, 590-603 **[0033]**
- 30 • Boger et al. J. Org. Chem., 2001, vol. 66, 6654-6661 **[0033]**
- Parham. J. Immunol., 1983, vol. 131, 2895-2902 **[0040]**
- Spring et al. J. Immunol., 1974, vol. 113, 470-478 **[0040]**
- Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys., 1960, vol. 89, 230-244 **[0040]**
- Burgess. Immunology Today, 1984, vol. 5, 155-158 **[0040]**
- 35 • O'Keefe et al. J. Biol. Chem., 1985, vol. 260, 932-937 **[0040]**
- J.D. Griffin et al. Leukemia Res., 1984, vol. 8, 521 **[0043]**
- Nadler et al. J. Immunol., 1983, vol. 131, 244-250 **[0043]**

- J. D. Griffin ; T. Hercend ; R. Beveridge ; S. F. Schlossman. J. Immunol, 1983, vol. 130, 2947 **[0048]**
- J. Carlsson ; H. Drevin ; R. Axen. Biochem. J., 1978, vol. 173, 723 **[0048]**
- W. A. Blattler et al. Biochemistry, 1985, vol. 24, 1517-1524 **[0049]**
- 5 • B. C. Laguzza et al. J. Med. Chem., 1989, vol. 32, 548-555 **[0050]**
- R. S. Greenfield et al. Cancer Res., 1990, vol. 50, 6600-6607 **[0050]**
- P. Senter et al. Photochemistry and Photobiology, 1985, vol. 42, 231-237 **[0051]**
- A. Trouet et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1982, vol. 79, 626-629 **[0052]**
- E. Aboud-Pirak et al. Biochem Pharmacol., 1989, vol. 38, 641-648 **[0053]**
- 10 • Carlsson et al. Biochem. J., 1978, vol. 173, 723-737 **[0055]**
- Goldmacher et al. J. Immunol., 1985, vol. 135, 3648-3651 **[0056]**
- Goldmacher et al. J. Cell Biol., 1986, vol. 102, 1312-1319 **[0056]**