(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 967 878**

(51) Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/5513 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2020 PCT/EP2020/056761**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2020 WO20187721**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2020 E 20711857 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3938372**

(54) Título: **Dímeros de azetidobenzodiazepina y conjugados que los comprenden para uso en el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

15.03.2019 GB 201903541
06.01.2020 GB 202000121

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2024

(73) Titular/es:

MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
1 Francis Crick Avenue, Cambridge Biomedical Campus
Cambridge CB2 0AA, GB

(72) Inventor/es:

HOWARD, PHILIP WILSON y
CAILLEAU, THAIS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

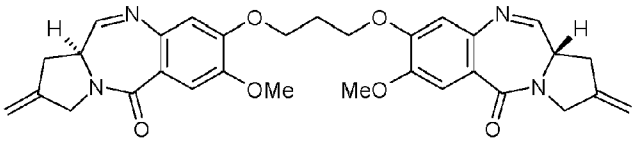
Dímeros de azetidobenzodiazepina y conjugados que los comprenden para uso en el tratamiento del cáncer

La presente invención se refiere a dímeros de azetidobenzodiazepina (ABD), conjugados que comprenden dichos dímeros y los enlazadores de fármacos precursores usados para preparar dichos conjugados.

Antecedentes de la invención

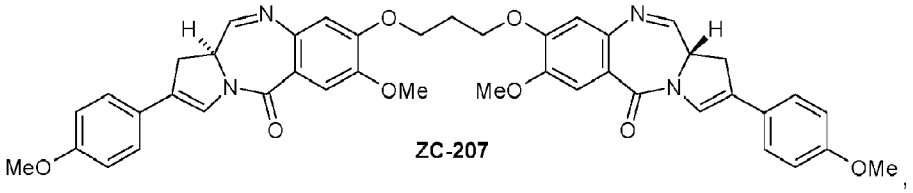
Se ha demostrado que los dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) son compuestos citotóxicos.

Por ejemplo, SG2000 (SJG-136):



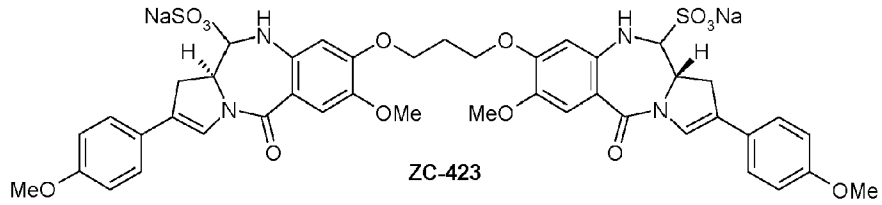
(Gregson, S.J., *et al.*, Chem. Commun., 1999, 797-798. doi: 10,1039/A809791G; Gregson, S., *et al.*, J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., *et al.*, Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); y Hartley, J.A., et al., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)) se ha incluido en ensayos clínicos como agente en solitario, por ejemplo, NCT02034227 que investiga su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica (véase: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227).

Compuestos diméricos de PBD que llevan sustituyentes arilo C2 junto con endoinsaturación, tales como SG2202 (ZC-207), se divulgan en el documento WO 2005/085251:



ZC-207

y en el documento WO2006/111759, bisulfitos de tales compuestos de PBD, por ejemplo, SG2285 (ZC-423):

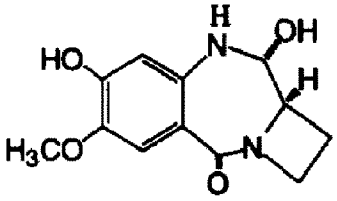


ZC-423

Se ha demostrado que estos compuestos son agentes citotóxicos muy útiles (Howard, P.W., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

Compuestos dímeros de PBD que tienen grupos enlazadores para la conexión a un agente de unión celular, tal como un anticuerpo, se describen en el documento WO 2011/130598. En estos compuestos, el enlazador está unido a una de las posiciones N10 disponibles, y generalmente se escinden por la acción de una enzima sobre el grupo enlazador. Los documentos WO 2014/057074 y WO 2015/052322 describen conjugados de dímeros de PBD específicos unidos a través de la posición N10 en un monómero.

En una etapa relativamente temprana en el desarrollo de los PBD como moléculas de interés, se describió en 1997 (Bose, D.S., *et al.*, Tetrahedron Letters, 38(33), 5839-5842, 1997; doi: 10.1016/S0040-4039(97)01297-5) que el siguiente compuesto:



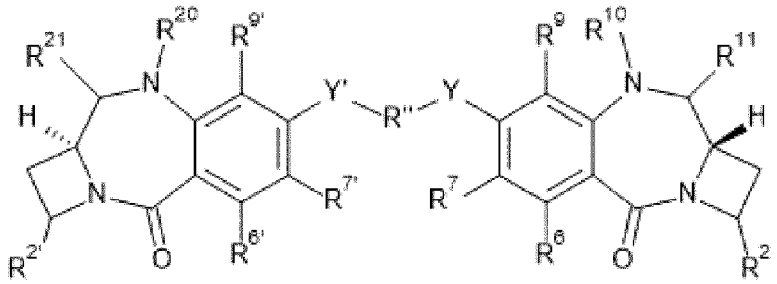
había sido sintetizado y sería evaluado como un potencial ligando de unión al ADN y agentes citotóxicos. No se realizó ninguna publicación adicional sobre este compuesto, por lo que parece que no eran estables para las pruebas o no eran activos.

El documento WO2018/192944 se refiere a conjugados que comprenden pirrolobenzodiazepinas y dímeros relacionados (PBD), y a los enlazadores de fármaco precursores utilizados para crear tales conjugados.

El documento WO2014/057122 se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD) que tienen un grupo protector C2 o N10 lábil en forma de un enlazador con un anticuerpo.

Divulgación de la invención

Un primer aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de fórmula IV:



IV

y sales y solvatos del mismo, en donde:

R^2 y $R^{2'}$ son H;
R^6 y R^9 se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo;
donde R y R' se seleccionan independientemente de alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, heterociclilo C_{3-20} y sistemas de anillos aromáticos que comprenden 5-20 átomos en el anillo;
o bien

a) R^7 se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo; $R^{7'}$ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo; o
(b) R^7 y $R^{7'}$ juntos forman un grupo que es: (i) $-O-(CH_2)_n-O-$, donde n es de 7 a 16; o (ii) $-O-(CH_2CH_2O)_m-$, donde m es de 2 a 5;

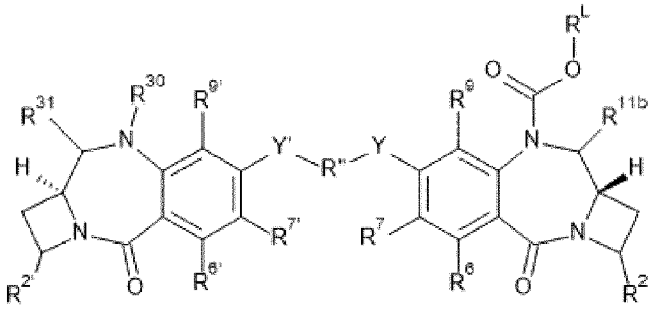
R'' es un grupo alquileno C_{3-12}, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, seleccionados de O, S, NR^{N2} donde R^{N2} es H o alquilo C_{1-4} y/o por anillos aromáticos, seleccionados de benceno o piridina;
Y e Y' se seleccionan de O, S o NH;
$R^{6'}$ y $r^{9'}$ se seleccionan de los mismos grupos que R^6 y R^9 respectivamente;
o bien

(i-a) R^{10} y R^{11} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos; o
(i-b) R^{10} es H y R^{11} se selecciona de OH y OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}; o (i-c) R^{10} y R^{11} son ambos H;

o bien

(ii-a) R^{20} y R^{21} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos; o
(ii-b) R^{20} es H y R^{21} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}; o
(ii-c) R^{20} y R^{21} son ambos H.

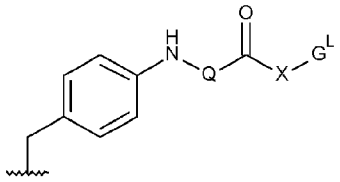
Un segundo aspecto de la presente invención comprende un compuesto con la fórmula I:



y sales y solvatos del mismo, en donde:

Y, Y', R", R^2, $R^{2'}$, R^6, $R^{6'}$, R^7, $R^{7'}$, R^9 y $R^{9'}$ son como se ha definido en el primer aspecto de la invención;
R^{11b} se selecciona de OH, OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}; y
R^L es un enlazador para conectar con un agente de unión celular, que se selecciona de:

(iiia):

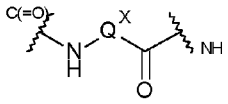


IIIa

,

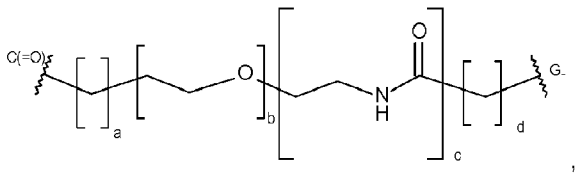
en donde

Q es:



,

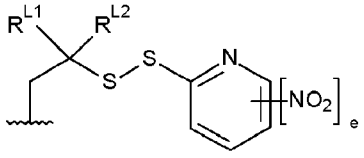
donde Q^X es tal que Q es un residuo de aminoácido, un residuo dipeptídico o un residuo tripeptídico;
X es:



,

donde a = de 0 a 5, b = de 0 a 16, c = 0 o 1, d = de 0 a 5;
G^L es un enlazador para conectar con un agente de unión celular; y

(iiib):



IIIb

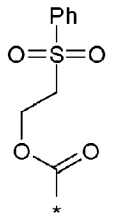
,

donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1;
o:

(a) R^{30} y R^{31} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos;

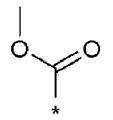
o
(b) R^{30} es H y R^{31} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4};
(c) R^{30} y R^{31} son ambos H; o
(d) R^{31} es OH u OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4} y R^{30} se selecciona de:

(i)



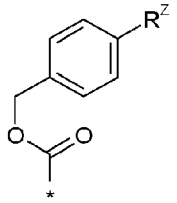
;

(ii)



;

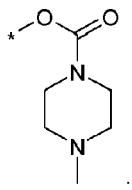
(iii)



,

donde R^Z se selecciona de:

(z-i)



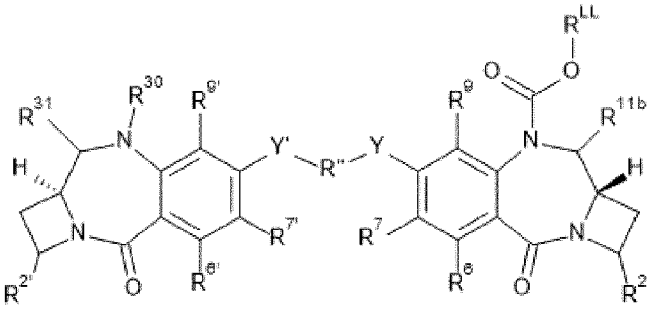
;

(z-ii) $OC(=O)CH_3$;
(z-iii) NO_2;
(z-iv) OMe;
(z-v) glucurónido;
(z-vi) $NH\text{-}C(=O)\text{-}X_1\text{-}NHC(=O)X_2\text{-}NH\text{-}C(=O)\text{-}R^{ZC}$, donde $-C(=O)-X_1-NH-$ y $-C(=O)-X_2-NH-$ representan residuos de aminoácidos naturales y R^{ZC} se selecciona de Me, OMe, CH_2CH_2OMe, y $(CH_2CH_2O)_2Me$.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona conjugados de fórmula II:

$$L\text{-}(D^L)_p \qquad (II)$$

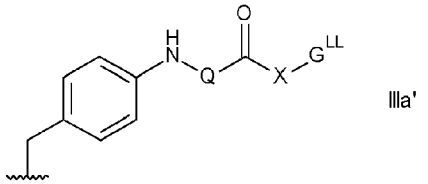
en donde L es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, D^L es una unidad de enlazador a fármaco de fórmula I*:



en donde R^2, $R^{2'}$, R^6, R^7, R^9, R^{11b}, Y, R'', Y', $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, R^{30} y R^{31} son como se ha definido en el segundo aspecto de la invención;

R^{LL} es un enlazador para la conexión al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se selecciona de:

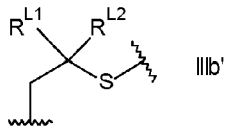
(iiia):



IIIa'

donde Q y X son como se ha definido en el primer aspecto y G^{LL} es un enlazador conectado al anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo; y

(iiib):



IIIb'

donde R^{L1} y R^{L2} son como se ha definido en el primer aspecto;
en donde p es un número entero de 1 a 20.

La unidad de ligando, descrita más completamente a continuación, es un agente de direccionamiento que se une a un resto diana. La unidad de ligando puede, por ejemplo, unirse específicamente a un componente celular (un agente de unión celular) o a otras moléculas diana de interés. La unidad de ligando puede ser, por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo u otro agente de unión, tal como una proteína de fusión Fc.

El cuarto aspecto proporciona un conjugado del tercer aspecto de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. El cuarto aspecto también proporciona un conjugado del tercer aspecto de la invención para uso en un método para tratar una enfermedad proliferativa que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado del segundo aspecto de la invención a un paciente que lo necesita.

Un experto habitual en la materia es capaz de determinar fácilmente si un conjugado experimental trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula en particular. Por ejemplo, los ensayos que pueden usarse convenientemente para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto en particular se describen en los ejemplos, a continuación.

La presente invención proporciona la síntesis de un conjugado del tercer aspecto de la invención que comprende conjugar un compuesto (enlazador de fármaco) del segundo aspecto de la invención con una unidad de ligando.

Los compuestos de fórmula IV son los inhibidores covalentes ("warheads") liberados por conjugados del tercer aspecto.

Definiciones

Sustituyentes

La expresión "opcionalmente sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que puede no estar sustituido o que puede estar sustituido.

A menos que se especifique otra cosa, el término "sustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo precursor que porta uno o más sustituyentes. El término "sustituyente" se usa en el presente documento en el sentido convencional y se refiere a un resto químico que está covalentemente unido o, si es adecuado, condensado a, un grupo precursor. Se conoce bien una amplia diversidad de sustituyentes, y también se conocen bien los métodos para su formación e introducción en una diversidad de grupos precursores.

A continuación se describen con más detalle algunos ejemplos de sustituyentes.

Alquilo C_{1-12}: El término "alquilo C_{1-12}" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarbonado que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, que puede ser alifático y que puede ser saturado. El término "alquilo C_{1-4}" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarbonado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, que es alifático y que está saturado. Los términos "alquenilo", alquinilo, cicloalquilo, etc., se analizan a continuación.

Algunos ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, pero no se limitan a, metilo (C_1), etilo (C_2), propilo (C_3), butilo (C_4), pentilo (C_5), hexilo (C_6) y heptilo (C_7).

Algunos ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, pero no se limitan a, metilo (C_1), etilo (C_2), n-propilo (C_3), n-butilo (C_4), n-pentilo (amilo) (C_5), n-hexilo (C_6) y n-heptilo (C_7).

Algunos ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C_3), iso-butilo (C_4), *sec*-butilo (C_4), *terc*-butilo (C_4), iso-pentilo (C_5), y neo-pentilo (C_5).

Alquenilo C_{2-12}: La expresión "alquenilo C_{2-12}", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

Algunos ejemplos de grupos alquenilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo, $-CH=CH_2$), 1-propenilo ($-CH=CH-CH_3$), 2-propenilo (alilo, $-CH-CH=CH_2$), isopropenilo (1-metilvinilo, $-C(CH_3)=CH_2$), butenilo (C_4), pentenilo (C_5) y hexenilo (C_6).

Alquinilo C_{2-12}: La expresión "alquinilo C_{2-12}", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono.

Algunos ejemplos de grupos alquinilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, etinilo ($-C\equiv CH$) y 2-propinilo (propargilo, $-CH_2-C\equiv CH$).

Cicloalquilo C_{3-12}: La expresión "cicloalquilo C_{3-12}", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que es también un grupo ciclilo; es decir, un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo alicíclico de un compuesto hidrocarbonado cíclico (carbocíclico), resto que tiene de 3 a 12 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 12 átomos en el anillo.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, los derivados de:

compuestos hidrocarbonados monocíclicos saturados:
ciclopropano (C_3), ciclobutano (C_4), ciclopentano (C_5), ciclohexano (C_6), cicloheptano (C_7), metilciclopropano (C_4), dimetilciclopropano (C_5), metilciclobutano (C_5), dimetilciclobutano (C_6), metilciclopentano (C_6), dimetilciclopentano (C_7) y metilciclohexano (C_7);
compuestos hidrocarbonados monocíclicos insaturados:
ciclopropeno (C_3), ciclobuteno (C_4), ciclopenteno (C_5), ciclohexeno (C_6), metilciclopropeno (C_4), dimetilciclopropeno (C_5), metilciclobuteno (C_5), dimetilciclobuteno (C_6), metilciclopenteno (C_6), dimetilciclopenteno (C_7) y metilciclohexeno (C_7); y
compuestos hidrocarbonados policíclicos saturados:
norcarano (C_7), norpinano (C_7), norbornano (C_7).

Heterociclilo C_{3-20}: La expresión "heterociclilo C_{3-20}", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un compuesto heterocíclico, resto que tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, de los que de 1 a 10 son heteroátomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los que de 1 a 4 son heteroátomos en el anillo.

En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C_{3-20}, C_{3-7}, C_{5-6}, etc.) indican el número de átomos en el anillo o el intervalo

del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "heterociclilo C_{5-6}", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

Algunos ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de:

N_1: aziridina (C_3), azetidina (C_4), pirrolidina (tetrahidropirrol) (C_5), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol) (C_5), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C_5), piperidina (C_6), dihidropiridina (C_6), tetrahidropiridina (C_6), acepina (C_7);
O_1: oxirano (C_3), oxetano (C_4), oxolano (tetrahidrofurano) (C_5), oxol (dihidrofurano) (C_5), oxano (tetrahidropirano) (C_6), dihidropirano (C_6), pirano C_6) y oxepina (C_7);
S_1: tiirano (C_3), tietano (C_4), tiolano (tetrahidrotiofeno) (C_5), tiano (tetrahidrotiopirano) (C_6), tiepano (C_7);
O_2: dioxolano (C_5), dioxano (C_6) y dioxepano (C_7); O_3: trioxano (C_6);
N_2: imidazolidina (C_5), pirazolidina (diazolidina) (C_5), imidazolina (C_5), pirazolina (dihidropirazol) (C_5), piperazina (C_6);
N_1O_1: tetrahidrooxazol (C_5), dihidrooxazol (C_5), tetrahidroisoxazol (C_5), dihidroisoxazol (C_5), morfolina (C_6), tetrahidrooxazina (C_6), dihidrooxazina (C_6), oxazina (C_6);
N_1S_1: tiazolina (C_5), tiazolidina (C_5), tiomorfolina (C_6);
N_2O_1: oxadiazina (C_6);
O_1S_1: oxatiol (C_5) y oxatiano (tioxano) (C_6); y,
$N_1O_1S_1$: oxatiazina (C_6).

Algunos ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen aquellos derivados de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C_5), tales como arabinofuranosa, lixofuranosa, ribofuranosa y xilofuranosa, y piranosas (C_6), tales como alopiranosa, altropiranosa, glucopiranosa, manopiranosa, gulopiranosa, idopiranosa, galactopiranosa y talopiranosa.

Arilo C_{5-20}: La expresión "arilo C_{5-20}", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo aromático de un compuesto aromático, resto que tiene de 5 a 20 átomos en el anillo. La expresión "arilo C_{5-7}", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo aromático de un compuesto aromático, teniendo dicho resto de 5 a 7 átomos en el anillo, y la expresión "arilo C_{5-10}", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto monovalente obtenido mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo en el anillo aromático de un compuesto aromático, resto que tiene de 5 a 10 átomos en el anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo.

En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C_{3-20}, C_{5-7}, C_{5-6}, C_{5-10}, etc.) indican el número de átomos en el anillo o el intervalo del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, la expresión "arilo C_{5-6}", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos en el anillo.

Los átomos del anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en los "grupos carboarilo".
Algunos ejemplos de grupos carboarilo incluyen, pero no se limitan a, los derivados del benceno (es decir, fenilo) (C_6), naftaleno (C_{10}), azuleno (C_{10}), antraceno (C_{14}), fenantreno (C_{14}), naftaceno (C_{18}) y pireno (C_{16}).

Algunos ejemplos de grupos arilo que comprenden anillos condensados, siendo al menos uno de ellos un anillo aromático, incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados del indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C_9), indeno (C_9), isoindeno (C_9), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (C_{10}), acenafteno (C_{12}), fluoreno (C_{13}), fenaleno (C_{13}), acefenantreno (C_{15}) y aceantreno (C_{16}).

Como alternativa, los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en los "grupos heteroarilo". Algunos ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico incluyen, pero no se limitan a, los derivados de:

N_1: pirrol (azol) (C_5), piridina (azina) (C_6);
O_1: furano (oxol) (C_5);
S_1: tiofeno (tiol) (C_5);
N_1O_1: oxazol (C_5), isoxazol (C_5), isoxazina (C_6);
N_2O_1: oxadiazol (furazano) (C_5);
N_3O_1: oxatriazol (C_5);
N_1S_1: tiazol (C_5), isotiazol (C_5);
N_2: imidazol (1,3-diazol) (C_5), pirazol (1,2-diazol) (C_5), piridazina (1,2-diazina) (C_6), pirimidina (1,3-diazina) (C_6) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C_6);
N_3: triazol (C_5), triazina (C_6); y,
N_4: tetrazol (C_5).

Algunos ejemplos de heteroarilo que comprenden anillos condensados, incluyen, pero no se limitan a:

C_9 (con 2 anillos condensados) derivado de benzofurano (O_1), isobenzofurano (O_1), indol (N_1), isoindol (N_1),

indolizina (N_1), indolina (N_1), isoindolina (N_1), purina (N_4) (por ejemplo, adenina, guanina), bencimidazol (N_2), indazol (N_2), benzoxazol (N_1O_1), bencisoxazol (N_1O_1), benzodioxol (O_2), benzofurazano (N_2O_1), benzotriazol (N_3), benzotiofurano (S_1), benzotiazol (N_1S_1), benzotiadiazol (N_2S);
C_{10} (con 2 anillos condensados) derivado de cromeno (O_1), isocromeno (O_1), cromano (O_1), isocromano (O_1), benzodioxano (O_2), quinolina (N_1), isoquinolina (N_1), quinolizina (N_1), benzoxazina (N_1O_1), benzodiazina (N_2), piridopiridina (N_2), quinoxalina (N_2), quinazolina (N_2), cinnolina (N_2), ftalazina (N_2), naftiridina (N_2), pteridina (N_4);
C_{11} (con 2 anillos condensados) derivados de benzodiazepina (N_2);
C_{13} (con 3 anillos condensados) derivado de carbazol (N_1), dibenzofurano (O_1), dibenzotiofeno (S_1), carbolina (N_2), perimidina (N_2), piridoindol (N_2); y,
C_{14} (con 3 anillos condensados) derivado de acridina (N_1), xanteno (O_1), tioxanteno (S_1), oxantreno (O_2), fenoxatiina (O_1S_1), fenazina (N_2), fenoxazina (N_1O_1), fenotiazina (N_1S_1), tiantreno (S_2), fenantridina (N_1), fenantrolina (N_2), fenazina (N_2).

Los grupos anteriores, bien solos o como parte de otro sustituyente, opcionalmente pueden estar ellos mismos sustituidos con uno o más grupos seleccionados de ellos mismos y los sustituyentes adicionales indicados a continuación.

Halo: -F, -Cl, -Br y -I.

Hidroxi: -OH.

Éter: -OR, en donde R es un sustituyente de éter, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado como un grupo alcoxi C_{1-7}, analizado más adelante), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también denominado grupo heterocicliloxi C_{3-20}) o un grupo arilo C_{5-20} (también denominado grupo ariloxi C_{5-20}), preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}.

Alcoxi: -OR, en donde R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}. Ejemplos de grupos alcoxi C_{1-7} incluyen, pero no se limitan a, -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (*sec*-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi), y -O(tBu) (*terc*-butoxi).

Acetal: $-CH(OR^1)(OR^2)$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes acetal, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R^1 y R^2, tomados junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y los átomos de carbono a los que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Algunos ejemplos de grupos acetal incluyen, pero no se limitan a, $-CH(OMe)_2$, $-CH(OEt)_2$ y -CH(OMe)(OEt).

Hemiacetal: $-CH(OH)(OR^1)$, en donde R^1 es un sustituyente de hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero no se limitan a, -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).

Cetal: $-CR(OR^1)(OR^2)$, donde R^1 y R^2 son como se han definido para los acetales, y R es un sustituyente de cetal diferente del hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos cetal incluyen, pero no se limitan a, $-C(Me)(OMe)_2$, $-C(Me)(OEt)_2$, -C(Me)(OMe)(OEt), $-C(Et)(OMe)_2$, $-C(Et)(OEt)_2$ y -C(Et)(OMe)(OEt).

Hemicetal: $-CR(OH)(OR^1)$, donde R^1 es como se ha definido para los hemiacetales, y R es un sustituyente de hemicetal diferente del hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, pero no se limitan a, -C(Me)(OH)(OMe), -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt) y -C(Et)(OH)(OEt).

Oxo (ceto, -ona): =O.

Tiona (tiocetona): =S.

Imino (imina): =NR, en donde R es un sustituyente de imina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a, =NH, =NMe, =NEt y =NPh.

Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): -C(=O)H.

Acilo (ceto): -C(=O)R, en donde R es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado alquilacilo C_{1-7} o alcanoílo C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también denominado heterociclilacilo C_{3-20}) o un grupo arilo C_{5-20} (también denominado arilacilo C_{5-20}), preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos acilo incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)CH_3$ (acetilo), $-C(=O)CH_2CH_3$ (propionilo), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (t-butirilo) y -C(=O)Ph (benzoílo, fenona).

Carboxi (ácido carboxílico): -C(=O)OH.

Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): -C(=S)SH.

Tiolocarboxi (ácido tiolocarboxílico): -C(=O)SH.

Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): -C(=S)OH.

Ácido imídico: -C(=NH)OH.

Ácido hidroxámico: -C(=NOH)OH.

Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): -C(=O)OR, en donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ y -C(=O)OPh.

Aciloxi (éster inverso): -OC(=O)R, en donde R es un sustituyente de aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}.

Algunos ejemplos de grupos aciloxi incluyen, pero no se limitan a, $-OC(=O)CH_3$ (acetoxi), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, -OC(=O)Ph y $-OC(=O)CH_2Ph$.

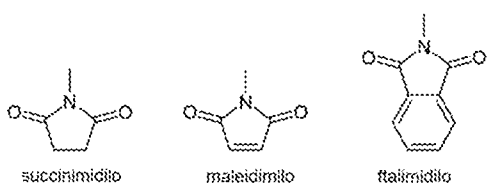
Oxicarboiloxi: -OC(=O)OR, en donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a, $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ y -OC(=O)OPh.

Amino: $-NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado alquilamino C_{1-7} o dialquilamino C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R^1 y R^2, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Los grupos amino pueden ser primarios ($-NH_2$), secundarios ($-NHR^1$o terciarios ($-NHR^1R^2$) y, en forma catiónica, pueden ser cuaternarios ($-^+NR^1R^2R^3$). Algunos ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$ y -NHPh. Algunos ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.

Amido (carbamoílo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-C(=O)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos amido incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$ y $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, así como grupos amido en los que R^1 y R^2, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidincarbonilo, morfolincarbonilo, tiomorfolincarbonilo y piperazincarbonilo.

Tioamido (tiocarbamilo): $-C(=S)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos amido incluyen, pero no se limitan a, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ y $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, en donde R^1 es un sustituyente de amida, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} y R^2 es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos acilamida incluyen, pero no se limitan a, $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$ y -NHC(=O)Ph. R^1 y R^2 pueden formar juntos una estructura cíclica, como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo y ftalimidilo:



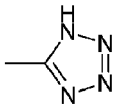
Aminocarboniloxi: $-OC(=O)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, pero no se limitan a, $-OC(=O)NH_2$, -OC(=O)NHMe, $-OC(=O)NMe_2$ y $-OC(=O)NEt_2$.

Ureido: $-N(R^1)CONR^2R^3$, en donde R^2 y R^3 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los

grupos amino, y R^1 es un sustituyente de ureido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos ureido incluyen, pero no se limitan a, -$NHCONH_2$, -NHCONHMe, -NHCONHEt, -$NHCONMe_2$, -$NHCONEt_2$, -$NMeCONH_2$, -NMeCONHMe, -NMeCONHEt, -$NMeCONMe_2$ y -$NMeCONEt_2$.

Guanidino: -NH-C(=NH)NH_2.

Tetrazolilo: un anillo aromático de cinco miembros que tiene cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono,



Imino: =NR, en donde R es un sustituyente de imina, por ejemplo, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos imino incluyen, pero no se limitan a, =NH, =NMe y =NEt.

Amidina (amidino): -C(=NR)NR_2, en donde cada R es un sustituyente de amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos amidina incluyen, pero no se limitan a, -C(=NH)NH_2, -C(=NH)NMe_2 y -C(=NMe)NMe_2.

Nitro: -NO_2.

Nitroso: -NO.

Azido: -N_3.

Ciano (nitrilo, carbonitrilo): -CN.

Isociano: -NC.

Cianato: -OCN.

Isocianato: -NCO.

Tiociano (tiocianato): -SCN.

Isotiociano (isotiocianato): -NCS.

Sulfhidrilo (tiol, mercapto): -SH.

Tioéter (sulfuro): -SR, en donde R es un sustituyente de tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado un grupo alquiltio C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos alquiltio C_{1-7} incluyen, pero no se limitan a, -SCH_3 y -SCH_2CH_3.

Disulfuro: -SS-R, en donde R es un sustituyente de disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} (también denominado en el presente documento como disulfuro de alquilo C_{1-7}). Algunos ejemplos de grupos disulfuro de alquilo C_{1-7} alquilo incluyen, pero no se limitan a, -$SSCH_3$ y -$SSCH_2CH_3$.

Sulfina (sulfinilo, sulfóxido): -S(=O)R, en donde R es un sustituyente de sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfina incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)CH_3 y -S(=O)CH_2CH_3.

Sulfona (sulfonilo): -$S(=O)_2$R, en donde R es un sustituyente de sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}, incluyendo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} fluorado o perfluorado. Algunos ejemplos de grupos sulfona incluyen, pero no se limitan a, -$S(=O)_2CH_3$ (metanosulfonilo, mesilo), -$S(=O)_2CF_3$ (triflilo), -$S(=O)_2CH_2CH_3$ (esilo), -$S(=O)_2C_4F_9$ (nonaflilo), -$S(=O)_2CH_2CF_3$ (tresilo), -$S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (taurilo), -$S(=O)_2$Ph (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-clorofenilsulfonilo (closilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalenosulfonato (napsilo) y 5-dimetilamino-naftalen-1-ilsulfonato (dansilo).

Ácido sulfínico (sulfino): -S(=O)OH, -SO_2H.

Ácido sulfónico (sulfo): -$S(=O)_2$OH, -SO_3H.

Sulfinato (éster de ácido sulfínico): -S(=O)OR; en donde R es un sustituyente de sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfinato incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)OCH_3 (metoxisulfinilo; sulfinato de metilo) y -S(=O)OCH_2CH_3 (etoxisulfinilo; sulfinato de etilo).

Sulfonato (éster de ácido sulfónico): -S(=O)$_2$OR, en donde R es un sustituyente de sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfonato incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)$_2$$OCH_3$ (metoxisulfonilo; sulfonato de metilo) y -S(=O)$_2$$OCH_2CH_3$ (etoxisulfonilo; sulfonato de etilo).

Sulfiniloxi: -OS(=O)R, en donde R es un sustituyente de sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen, pero no se limitan a, -OS(=O)CH_3 y -OS(=O)CH_2CH_3.

Sulfoniloxi: -OS(=O)$_2$R, en donde R es un sustituyente de sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen, pero no se limitan a, -OS(=O)$_2$$CH_3$ (mesilato) y -OS(=O)$_2$$CH_2CH_3$ (esilato).

Sulfato: -OS(=O)$_2$OR; en donde R es un sustituyente de sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfato incluyen, pero no se limitan a, -OS(=O)$_2$$OCH_3$ y -SO(=O)$_2$$OCH_2CH_3$.

Sulfamilo (sulfamoílo; amida de ácido sulfínico; sulfinamida): -S(=O)NR^1R^2, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos sulfamilo incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)NH_2, -S(=O)NH(CH_3), -S(=O)N(CH_3)$_2$, -S(=O)NH(CH_2CH_3), -S(=O)N(CH_2CH_3)$_2$ y -S(=O)NHPh.

Sulfonamido (sulfinamoílo; amida de ácido sulfónico; sulfonamida): -S(=O)$_2$$NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, pero no se limitan a, -S(=O)$_2$$NH_2$, -S(=O)$_2$NH($CH_3$), -S(=O)$_2$N($CH_3$)$_2$, -S(=O)$_2$NH($CH_2CH_3$), -S(=O)$_2$N($CH_2CH_3$)$_2$ y -S(=O)$_2$NHPh.

Sulfamino: -NR^1S(=O)$_2$OH, en donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino. Algunos ejemplos de grupos sulfamino incluyen, pero no se limitan a, -NHS(=O)$_2$OH y -N(CH_3)S(=O)$_2$OH.

Sulfonamino: -NR^1S(=O)$_2$R, en donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino, y R es un sustituyente de sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfonamino incluyen, pero no se limitan a, -NHS(=O)$_2$$CH_3$ y -N(CH_3)S(=O)$_2$$C_6H_5$.

Sulfinamino: -NR^1S(=O)R, en donde R^1 es un sustituyente de amino, como se define para los grupos amino, y R es un sustituyente sulfinamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7}. Algunos ejemplos de grupos sulfinamino incluyen, pero no se limitan a, -NHS(=O)CH_3 y -N(CH_3)S(=O)C_6H_5.

Fosfino (fosfina): -PR_2, en donde R es un sustituyente de fosfino, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosfino incluyen, pero no se limitan a, -PH_2, -P(CH_3)$_2$, -P(CH_2CH_3)$_2$, -P(t-Bu)$_2$ y -P(Ph)$_2$.

Fosfo: -P(=O)$_2$.

Fosfinilo (óxido de fosfina): -P(=O)R_2, en donde R es un sustituyente de fosfinilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosfinilo incluyen, pero no se limitan a, -P(=O)(CH_3)$_2$, -P(=O)(CH_2CH_3)$_2$, -P(=O)(t-Bu)$_2$ y -P(=O)(Ph)$_2$.

Ácido fosfónico (fosfono): -P(=O)(OH)$_2$.

Fosfonato (éster de fosfono): -P(=O)(OR)$_2$, en donde R es un sustituyente de fosfonato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosfonato incluyen, pero no se limitan a, -P(=O)(OCH_3)$_2$, -P(=O)(OCH_2CH_3)$_2$, -P(=O)(O-t-Bu)$_2$ y -P(=O)(OPh)$_2$.

Ácido fosfórico (fosfonoxi): -OP(=O)(OH)$_2$.

Fosfato (éster de fosfonoxi): -OP(=O)(OR)$_2$, donde R es un sustituyente de fosfato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo

C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosfato incluyen, pero no se limitan a, $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)(O\text{-}t\text{-}Bu)_2$ y $-OP(=O)(OPh)_2$.

Ácido fosforoso: $-OP(OH)_2$.

Fosfito: $-OP(OR)_2$, donde R es un sustituyente de fosfito, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C_{1-7}, un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosfito incluyen, pero no se limitan a, $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O\text{-}t\text{-}Bu)_2$ y $-OP(OPh)_2$.

Fosforamidita: $-OP(OR^1)-NR^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidita, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosforamidita incluyen, pero no se limitan a, $-OP(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)-N(i\text{-}Pr)_2$ y $-OP(OCH_2CH_2CN)-N(i\text{-}Pr)_2$.

Fosforamidato: $-OP(=O)(OR^1)-NR^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidato, por ejemplo, -H, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20}, preferentemente -H, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20}. Algunos ejemplos de grupos fosforamidato incluyen, pero no se limitan a, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)-N(i\text{-}Pr)_2$ y $-OP(=O)(OCH_2CH_2CN)-N(i\text{-}Pr)_2$.

Alquileno

Alquileno C_{3-12}: La expresión "alquileno C_{3-12}", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto bidentado obtenido mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno, bien ambos del mismo átomo de carbono o bien uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes, de un compuesto hidrocarbonado que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (salvo que se indique otra cosa), que son alifáticos y que están saturados. Los términos "alquenileno", alquinileno, cicloalquileno, etc., se analizan a continuación.

Algunos ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} lineales saturados incluyen, pero no se limitan a, $-(CH_2)_n-$ donde n es un número entero de 3 a 12, por ejemplo, $-CH_2CH_2CH_2-$(propileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$(butileno), $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$(pentileno) y $-CH_2CH_2CH_2CH-_2CH_2CH_2CH_2-$(heptileno).

Algunos ejemplos de grupos alquileno C_{3-12} ramificados saturados incluyen, pero no se limitan a, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$ y $-CH_2CH(CH_2CH_3)CH_2-$.

Ejemplos de grupos alquenileno y alquinileno C_{3-12} incluyen, pero no se limitan a, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH_2-CH=CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH=CH-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$, $-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-$ y $-CH_2-C\equiv C-CH_2-$.

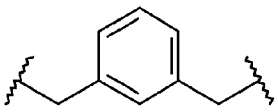
Ejemplos de grupos alquenileno y alquinileno C_{3-12} ramificados incluyen, pero no se limitan a, $-C(CH_3)=CH-$, $-C(CH_3)=CH-CH_2-$, $-CH=CH-CH(CH_3)-$ y $-C\equiv C-CH(CH_3)-$.

Ejemplos de cicloalquilenos C_{3-12} incluyen, pero no se limitan a, ciclopentileno (por ejemplo, ciclopent-1,3-ileno) y ciclohexileno (por ejemplo, ciclohex-1,4-ileno).

Ejemplos de cicloalquilenos C_{3-12} incluyen, pero no se limitan a, ciclopentenileno (por ejemplo, 4-ciclopenten-1,3-ileno), ciclohexenileno (por ejemplo, 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

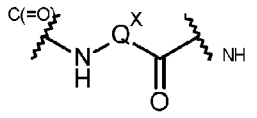
Donde el grupo alquileno C_{3-12} está interrumpido por un heteroátomo, el subíndice se refiere al número de átomos en la cadena, incluidos los heteroátomos. Por ejemplo, la cadena $-C_2H_4-O-C_2H_4-$ sería un grupo C_5.

Donde el grupo alquileno C_{3-12} está interrumpido por un anillo aromático, el subíndice se refiere al número de átomos directamente en la cadena, incluido el anillo aromático. Por ejemplo, la cadena



sería un grupo C_5.

Marcadores de conexión: En la fórmula



los marcadores en superíndice C(=O) y ^{NH} indican el grupo al que están unidos los átomos. Por ejemplo, el grupo NH se muestra unido a un carbonilo (que no forma parte del resto ilustrado) y el carbonilo se muestra unido a un grupo NH (que no forma parte del resto ilustrado).

Unidad de ligando

La unidad de ligando puede incluir una proteína, polipéptido, péptido y un agente no peptídico que se une específicamente a una molécula diana. La unidad de ligando puede ser una proteína, polipéptido o péptido. La unidad de ligando puede ser un polipéptido cíclico. Estas unidades de ligando incluyen anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión a la molécula diana.

Las expresiones "se une específicamente" y "unión específica" se refieren a la unión de un anticuerpo u otra proteína, polipéptido o péptido a una molécula predeterminada (por ejemplo, un antígeno). Normalmente, el anticuerpo u otra molécula se une con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{7} M^{-1} y se une a la molécula predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a una molécula no específica (por ejemplo, BSA, caseína) distinta de la molécula predeterminada o una molécula estrechamente relacionada.

Ejemplos de unidades de ligando incluyen los agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

En algunas realizaciones, la unidad de ligando es un agente de unión celular que se une a una diana extracelular en una célula. El agente de unión celular es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Así, en una realización, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC).

Agente de unión celular

Un agente de unión celular puede ser de cualquier tipo e incluye péptidos y no péptidos. Estos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, miméticos hormonales, vitaminas, factores de crecimiento, moléculas transportadoras de nutrientes, o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular.

Péptidos

En una realización, el agente de unión celular es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-30, preferentemente 6-20, residuos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión celular esté unido a un compuesto de monómero o dímero de azetidobenzodiazepina.

En una realización, el agente de unión celular comprende un péptido que se une a la integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ sobre XYS.

En una realización, el agente de unión celular comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Como alternativa, se puede usar una variante de la secuencia A20FMDV-Cys en donde una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos se sustituyen por otro residuo de aminoácido. Asimismo, el polipéptido puede tener la secuencia NAVXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos multivalentes y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmunoespecífica a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, incluyendo dichas dianas, pero no se limitan a, una célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por

ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie, incluyendo de origen humano, murino o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo completo, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab")_2$ y fragmentos scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítopo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Asimismo, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo estando obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al.*, (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597 o a partir de ratones transgénicos que portan un sistema de inmunoglobulina totalmente humano (Lonberg (2008) Curr. Opinion 20 (4): 450-459).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.

Algunos ejemplos de agentes de unión celular incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

Los antígenos asociados a tumor y los anticuerpos afines para su uso en realizaciones de la presente invención se enumeran a continuación y se describen con más detalle en las páginas 14 a 86 del documento WO 2017/186894.

(1) BMPR1B (receptor de tipo IB de proteína morfogenética ósea)
(2) E16 (LAT1, SLC7A5)
(3) STEAP1 (antígeno epitelial de próstata de seis transmembrana)
(4) 0772P (CA125, MUC16)
(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina)
(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato de sodio), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b)
(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema 25, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similar a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B)
(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, gen de ADNc de RIKEN 2700050C12)
(9) ETBR (receptor de endotelina de tipo B)
(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315)
(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado con cáncer de próstata, proteína 1 asociada con cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis transmembrana de próstata 2, proteína seis transmembrana de próstata)
(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico receptor de potencial transitorio 5, subfamilia M, miembro 4)
(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma)
(14) CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein-Barr) o Hs.73792)
(15) CD79b (CD79B, CD79β, IGb (beta asociada a inmunoglobulina), B29)
(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína de anclaje de fosfatasa que contiene el dominio SH2 1a), SPAP1B, SPAP1C)
(17) HER2 (ErbB2)
(18) NCA (CEACAM6)
(19) MDP (DPEP1)
(20) IL20R-alfa (IL20Ra, ZCYTOR7)

(21) Brevican (BCAN, BEHAB)
(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)
(23) ASLG659 (B7h)
(24) PSCA (precursor de antígeno de células madre de próstata)
(25) GEDA
(26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor 3 de BlyS, BR3)
(27) CD22 (isoforma del receptor de linfocitos B CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)
(27a) CD22 (molécula CD22)
(28) CD79a (CD79A, CD79alfa), asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM, transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B), pI: 4,84, PM: 25028 TM: 2 [P] Cromosoma del gen: 19q13.2).
(29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, actúa en la migración de linfocitos y la defensa humoral, tiene un papel 10 en la infección por VIH-2 y quizás en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pI: 8.54 PM: 41959 TM: 7 [P] Cromosoma del gen: 11q23.3,
(30) HLA-DOB (subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y 20 los presenta a linfocitos T CD4+); 273 aa, pI: 6,56, PM: 30820.TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 6p21.3)
(31) P2X5 (Receptor purinérgico P2X del canal de iones controlado por ligando 5, un canal de iones activado por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, su deficiencia puede contribuir a la fisiopatología de la inestabilidad del detrusor idiopática); 422 aa), pI: 7,63, PM: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 17p13.3).
(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2); 359 aa, pI: 8,66, PM: 40225, TM: 1 5 [P] cromosoma del gen: 9p13.3).
(33) LY64 (Antígeno linfocitario 64 (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y la apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función se asocia con un aumento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematoso sistémico); 661 aa, pI: 6,20, PM: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 5q12).
(34) FcRH1 (proteína 1 análoga al receptor Fc, un supuesto receptor del dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios similares a Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación 20 de linfocitos B); 429 aa, pI: 5,28, PM: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 1q21-1q22)
(35) IRTA2 (asociada a translocación del receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas 2, un supuesto inmunorreceptor con posibles papeles en el desarrollo de linfocitos B y la linfomagénesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias malignas de linfocitos B); 977 aa, pI: 6,88, PM: 106468, TM: 1 [P] Cromosoma del gen: 1q21)
(36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, supuesta transmembrana
35 proteoglicano, relacionado con la familia de factores de crecimiento de EGF/herregulina y folistatina); 374 aa)
(37) PSMA - FOLH1 (Folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de próstata) 1)
(38) SST (Receptor de somatostatina; cabe señalar que hay 5 subtipos)

(38.1) SSTR2 (Receptor de somatostatina 2)
(38.2) SSTR5 (Receptor de somatostatina 5)
(38,3) SSTR1
(38,4) SSTR3
(38,5) SSTR4

AvB6 - Ambas subunidades (39+40)

(39) ITGAV (Integrina, alfa V)
(40) ITGB6 (Integrina, beta 6)
(41) CEACAM5 (molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5)
(42) MET (protooncogén met; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)
(43) MUC1 (Mucina 1, asociada a la superficie celular)
(44) CA9 (anhidrasa carbónica IX)
(45) EGFRvIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante de transcrito 3,
(46) CD33 (molécula CD33)
(47) CD19 (molécula CD19)
(48) IL2RA (receptor de interleucina 2, alfa); secuencia de referencia del NCBI: NM_000417.2);
(49) AXL (receptor tirosina cinasa AXL)
(50) CD30 - TNFRSF8 (Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 8)
(51) BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B) - TNFRSF17 (superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 17)
(52) Ag de CT - ATC (antígenos de cáncer de testículo)
(53) CD174 (Lewis Y) - FUT3 (fucosiltransferasa 3 (galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa, grupo sanguíneo de Lewis)
(54) CLEC14A (familia de dominios de lectina de tipo C 14, miembro A; n.º de referencia de Genbank NM175060)

(55) GRP78 - HSPA5 (proteína de choque térmico de 70k Da 5 (proteína regulada por glucosa, 78 kDa)
(56) CD70 (molécula CD70) L08096
(57) Antígenos específicos de células madre. Por ejemplo:

- 5T4 (véase la entrada (63) a continuación)
- CD25 (véase la entrada (48) anterior)
- CD32
- LGR5/GPR49
- Prominina/CD133

(58) ASG-5
(59) ENPP3 (Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3)
(60) PRR4 (rico en prolina 4 (lagrimal))
(61) GCC - GUCY2C (guanilato ciclasa 2C (receptor de enterotoxina termoestable)
(62) Liv-1 - SLC39A6 (familia de transportadores de soluto 39 (transportador de zinc), miembro 6)
(63) 5T4, Glucoproteína de trofoblastos, TPBG - TPBG (glucoproteína de trofoblastos)
(64) CD56 - NCMA1 (molécula de adhesión de células neurales 1)
(65) CanAg (antígeno asociado a tumor CA242)
(66) FOLR1 (receptor de folato 1)
(67) GPNMB (glucoproteína (transmembrana) nmb
(68) TIM-1 - HAVCR1 (receptor celular del virus de la hepatitis A 1)
(69) RG-1/Diana de tumor de próstata Mindin - Mindin/RG-1
(70) B7-H4 - VTCN1 (dominio V-set que contiene el inhibidor de la activación de linfocitos T 1
(71) PTK7 (proteína tirosina cinasa 7 PTK7)
(72) CD37 (molécula CD37)
(73) CD138 - SDC1 (sindecano 1)
(74) CD74 (molécula CD74, complejo principal de histocompatibilidad, cadena invariante de clase II)
(75) Claudinas - CLs (Claudinas)
(76) EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (homólogo del oncogén vírico de la leucemia eritroblástica v-erb-b2 3 (aviar))
(78) RON - MST1R (receptor del estimulador de macrófagos 1 (tirosina cinasa relacionada con c-met))
(79) EPHA2 (receptor de EPH A2)
(80) CD20 - MS4A1 (4 dominios transmembrana, subfamilia A, miembro 1)
(81) Tenascina C - TNC (Tenascina C)
(82) FAP (Proteína activadora de fibroblastos, alfa)
(83) DKK-1 (homólogo de Dickkopf 1 (*Xenopus laevis*)
(84) CD52 (molécula CD52)
(85) CS1 - SLAMF7 (miembro de la familia SLAM 7)
(86) Endoglina - ENG (Endoglina)
(87) Anexina A1 - ANXA1 (Anexina A1)
(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (molécula de adhesión de células vasculares 1)

Un antígeno adicional asociado al tumor y anticuerpos afines de interés son:
(89) ASCT2 (transportador ASC 2, también conocido como SLC1A5). Los anticuerpos ASCT2 se describen en el documento WO 2018/089393.

El agente de unión celular puede estar marcado, por ejemplo, para ayudar a la detección o purificación del agente, ya sea antes de su incorporación como conjugado, o como parte del conjugado. El marcador puede ser un marcador de biotina. En otra realización, el agente de unión celular puede estar marcado con un radioisótopo.

Métodos de tratamiento

Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en un método de terapia. También se proporcionan los compuestos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de fórmula**II**. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para mostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y la evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, está dentro de la responsabilidad de los médicos de cabecera y otros médicos.

Un conjugado puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección que se va a tratar. Algunos ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia (la administración de agentes activos, incluyendo, por ejemplo, fármacos; cirugía; y radioterapia).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente

invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un conjugado de fórmula **II**, un excipiente farmacéuticamente aceptable, transportador, tampón, un estabilizador u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del transportador o de otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un transportador sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un transportador líquido tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un transportador sólido tal como gelatina.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de aflicción, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos pertinentes en la materia serán bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

Los conjugados pueden utilizarse para tratar una enfermedad proliferativa y una enfermedad autoinmunitaria. La expresión "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o incontrolada de células excesivas o anormales que no es deseada, tal como, un crecimiento neoplásico o hiperplásico, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Algunos ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, pero no se limitan a, proliferación celular benigna, premaligna y maligna, lo que incluye, pero no se limita a, neoplasias y tumores (por ejemplo, histocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer de intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conjuntivos) y ateroesclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, pero no se limitan a, neoplasias hematológicas; tal como leucemias y linfomas, tal como linfoma no Hodgkin y subtipos tales como LDCBG, zona marginal, zona del manto y folicular, linfoma hodgkiniano, LMA y otros cánceres de origen en linfocitos B o T.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen los siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica), artritis psoriásica, oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmunitario, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, ateroesclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerodermia generalizada, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, desmotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, espondolitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, poliarteritis nodosa, vasculitis necrosante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolipídico, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumopatía de los avicultores, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción a transfusiones, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, el dengue, encefalomielitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevado persistente, psoriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariosis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad del injerto frente a hospedador, rechazo de trasplantes, miocardiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome de Evan e insuficiencia gonadal autoinmunitaria.

En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de los linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo I), linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis, o enfermedad de injerto contra hospedador), o linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis

alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis generalizada y enfermedad del injerto contra el hospedador crónica). En general, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de linfocitos Th1 o linfocitos Th2. En algunas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es un trastorno inmunitario mediado por linfocitos T.

En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/kg por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad del conjugado administrado varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg por dosis.

Carga de fármaco

La carga de fármaco (p) es el número promedio de fármacos de ABD por agente de unión celular, por ejemplo, anticuerpo. Donde los compuestos de la invención están unidos a cisteínas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por agente de unión celular, es decir, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están unidos covalentemente al agente de unión celular. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de agentes de unión celular, p. ej., anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. Donde los compuestos de la invención están unidos a lisinas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 80 fármacos (D) por agente de unión celular, aunque puede preferirse un límite superior de 40, 20, 10 u 8. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de agentes de unión celular, p. ej., anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 80, de 1 a 40, de 1 a 20, de 1 a 10 o de 1 a 8.

El número promedio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como UV, HPLC en fase inversa, HIC, espectroscopía de masas, ensayo ELISA y electroforesis. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. Mediante un ELISA, puede determinarse el valor promedio de p en una preparación en particular de ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no es discernible por la unión de anticuerpo-antígeno y la limitación de detección del ELISA. Además, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina dónde están unidos los restos de fármaco al anticuerpo, tales como los fragmentos de la cadena pesada o de la cadena ligera, o los restos de aminoácidos en particular. En algunos casos, la separación, la purificación y la caracterización de los ADC homogéneos donde p es un determinado valor de ADC con otras cargas de fármaco puede lograrse por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis. Dichas técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de fijación del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener únicamente uno o varios grupos tiol de cisteína o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede fijarse un enlazador. Una carga de fármaco más alta, por ejemplo, $p > 5$, puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpo-fármaco.

Normalmente, se conjugan menos del máximo teórico de restos de fármaco con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el enlazador de fármaco. Únicamente los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que reacciona con aminas. Además, únicamente los grupos tiol de cisteínas más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que reacciona con tiol. En general, los anticuerpos no contienen muchos, en caso de producirse, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan ser unidos al resto de fármaco. La mayoría de residuos tiol de cisteína de los anticuerpos de los compuestos existen como puentes disulfuro y deben ser reducidos con un agente reductor tal como ditiotreitol (DTT) o TCEP, en unas condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitar el exceso molar de enlazador de fármaco con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) limitar o reducir parcialmente las condiciones reductoras para la modificación del tiol de la cisteína.

Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitol). Por tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o en un fragmento del mismo) modificando uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más residuos de aminoácido cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña la modificación de anticuerpos mediante la introducción de aminoácidos de cisteína

reactivos.

Pueden modificarse los aminoácidos de cisteína de los sitios reactivos de un anticuerpo y que no forman uniones de disulfuro intracatenarias o intermoleculares (Junutula, *et al.*, 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114 (13): 2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249). Los tioles de cisteína modificados genéticamente pueden reaccionar con reactivos enlazadores o reactivos enlazadores de fármacos de la presente invención que reaccionan con tioles, grupos electrófilos como maleimida o alfa-halo amidas para formar ADC con anticuerpos modificados con cisteína y los restos del fármaco ABD. La ubicación del resto de fármaco puede de esta manera diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco puede controlarse, ya que los grupos tiol de cisteína modificados normalmente reaccionan con reactivos enlazadores que reaccionan con tiol o con reactivos enlazadores de fármacos con un alto rendimiento. Modificar un anticuerpo de IgG para introducir un aminoácido cisteína mediante la sustitución en un único sitio en la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Puede conseguirse una carga de fármaco cercana a 2 casi con homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Cuando más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermedio enlazador de fármaco o un reactivo enlazador seguido de un reactivo de resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos ADC con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida tales como en fase inversa polimérica (PLRP) y de interacción hidrófoba (HIC) pueden separar los compuestos de la mezcla según el valor de carga de fármaco. Pueden aislarse las preparaciones de ADC con un único valor de carga de fármaco (p), sin embargo, estos ADC de valor de carga único pueden seguir siendo aún mezclas heterogéneas porque los restos de fármaco pueden estar unidos, a través del enlazador, a diferentes sitios del anticuerpo.

Por lo tanto, las composiciones conjugadas de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos conjugados anticuerpo-fármaco donde el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco ABD y donde los restos de fármaco pueden estar unidos al anticuerpo en diversos restos de aminoácidos.

En una realización, el número promedio de grupos dímeros de azetidobenzodiazepina por agente de unión celular está en el intervalo de 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo se selecciona de 1 a 8, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4 y de 4 a 8.

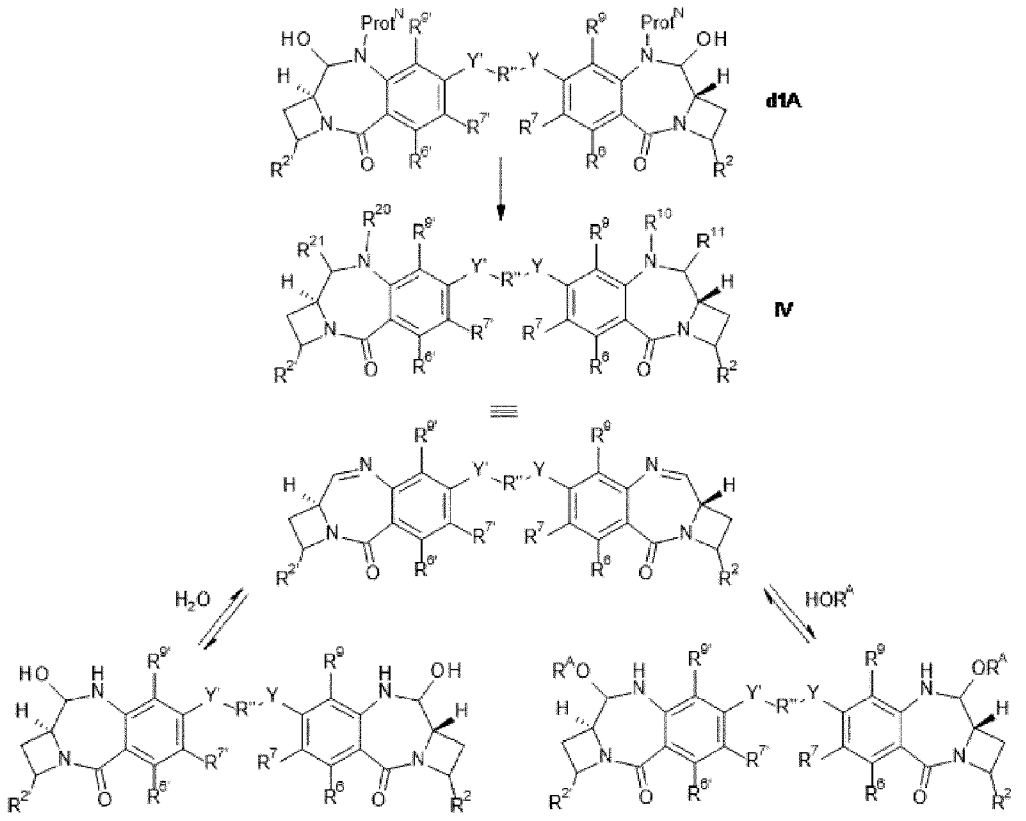
En algunas realizaciones, hay un grupo dímero de azetidobenzodiazepina por agente de unión celular.

Rutas sintéticas generales

Un gran número de grupos protectores N-Prot^{N}, O-Prot^{O} e Y-Prot^{Y} se describen en Greene, T.W. y Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Síntesis de compuestos de fórmula IV

Una posible etapa en la síntesis de los compuestos del primer aspecto de la invención, particularmente el compuesto de fórmula IV, se ilustra en el Esquema 1. Este comienza a partir de un dímero de ABD protegido con N10 **(d1A)**.

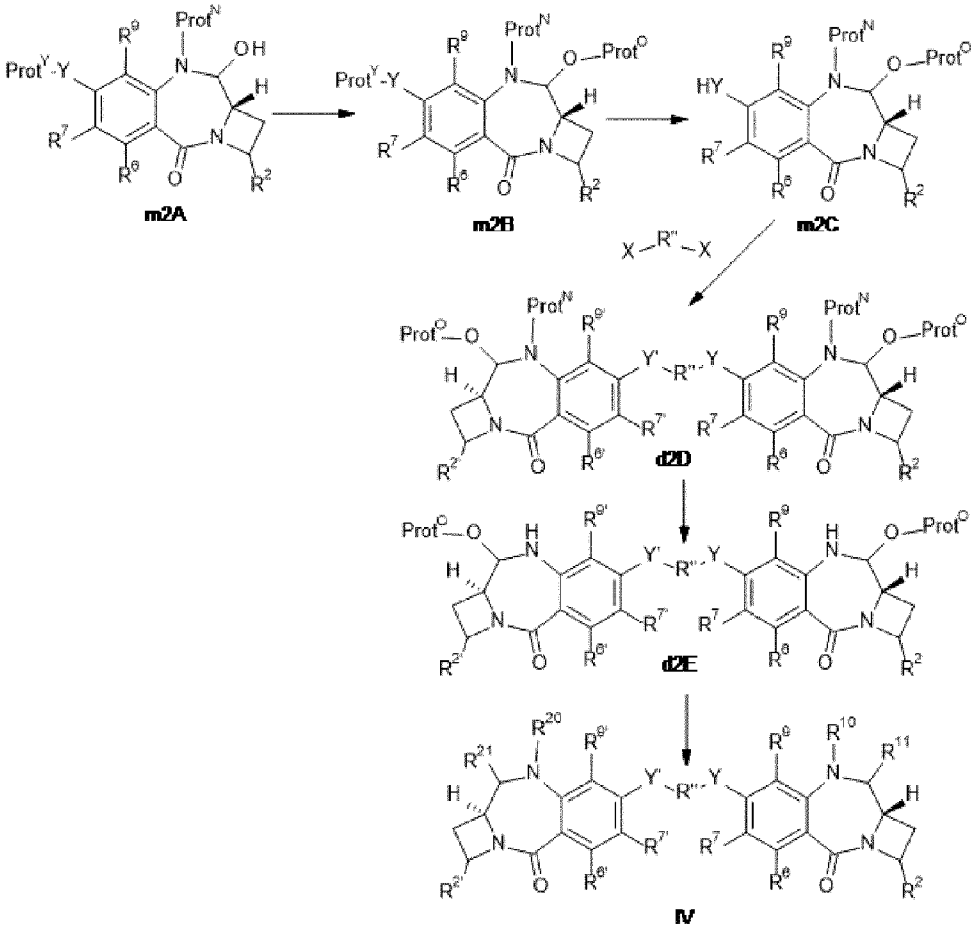


Esquema 1

El dímero d1A se desprotege en la posición N10 mediante métodos estándar para proporcionar el compuesto de fórmula IV. En los casos donde $Prot^N$ es Alloc, la desprotección se lleva a cabo con paladio. El compuesto producido puede estar en su forma de carbinolamina o éter de carbinolamina dependiendo de los disolventes usados, en equilibrio con una imina.

En el caso de los ABD, la tensión del anillo de azetidina de cuatro miembros significa que la forma carbinolamina es dominante en el equilibrio.

En el Esquema 2 se ilustra una etapa alternativa en la síntesis de los compuestos de fórmula IV. Este comienza a partir del monómero de ABD protegido con nitrógeno N10 (m2A).



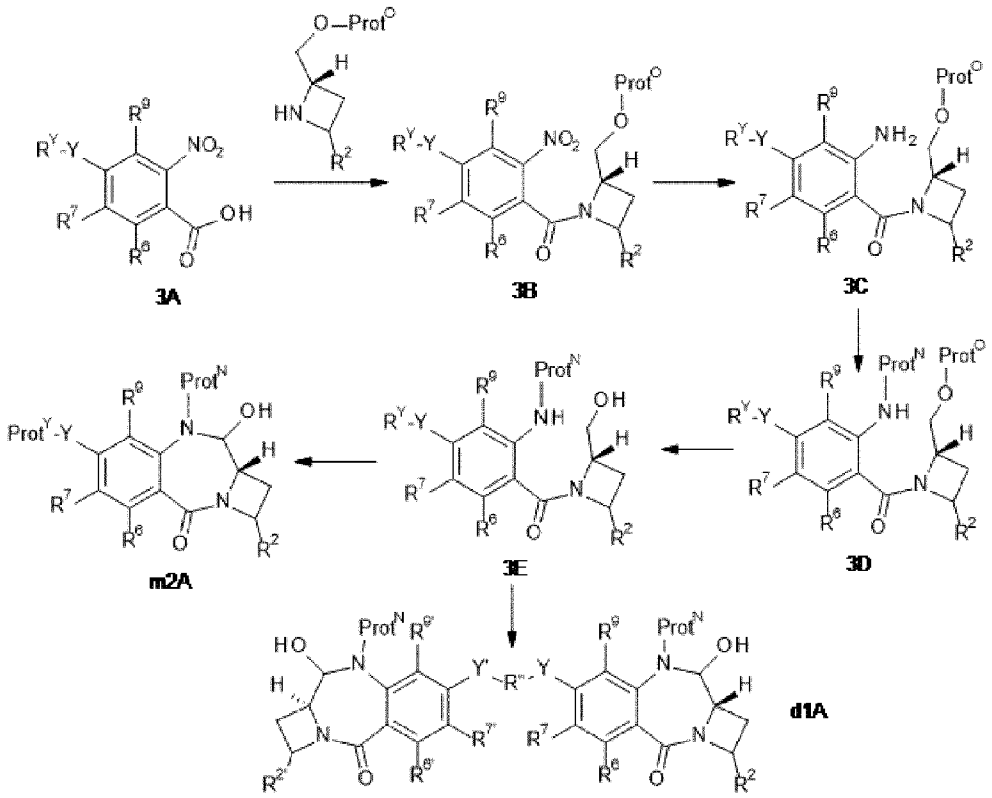
Esquema 2

El monómero de ABD m2A protegido en la posición N10 e Y8 está protegido en la posición C11 con alcohol para dar **m2B**. Preferentemente, $Prot^O$ es TBS y la protección se logra añadiendo un exceso de TBS-Cl. La posterior desprotección del grupo protector $Prot^Y$-Y proporciona una especie dimerizable **(m2C)**. Cuando $Prot^Y$ es TIPS, la desprotección se puede lograr con LiOAc en DMF y agua.

m2c se hace reaccionar con un enlazador de dímero $R''(X)_2$ para obtener el dímero **d2D**. Normalmente, Y es O y X es un halógeno (preferentemente Br). En este caso, una doble síntesis de éter de Williamson forma el dímero, utilizando un aditivo TBAI.

El grupo protector N10 se elimina del producto dímero para dar **d2E**. Por ejemplo, si $Prot^N$ es Alloc y $Prot^O$ es un grupo protector de oxígeno para la síntesis, entonces la desprotección se lleva a cabo usando paladio para eliminar el grupo protector N10, seguido de la eliminación del grupo protector de oxígeno para la síntesis. Si $Prot^N$ es Troc y $Prot^O$ es un grupo protector de oxígeno para la síntesis, entonces la desprotección se realiza usando un par Cd/Pb. Si $Prot^N$ es SEM o un grupo análogo, y $Prot^O$ es un grupo oxo, entonces el grupo oxo puede eliminarse por reducción, lo que conduce a un intermedio de carbinolamina protegida, que a continuación puede tratarse para eliminar el grupo protector SEM seguido de la eliminación del agua. La eliminación del grupo protector alcohol en la posición C11 proporciona el compuesto de fórmula IV. Si $Prot^O$ es TBS, la desprotección del alcohol puede ocurrir concomitantemente con la desprotección Alloc N antes mencionada usando paladio y pirrolidina en DCM.

El dímero **d1A** y el monómero **m2A** requerido para los esquemas 1 y 2 respectivamente, puede ser sintetizado por varias rutas. Una ruta posible, mediante cierre de anillo oxidativo, se ilustra en el Esquema 3.



Esquema 3

Los compuestos **3A, 3B, 3C, 3D** y **3E** pueden ser diméricos (donde el grupo R^Y representa R" conectado a un precursor de ABD similar) o monomérico (donde el grupo R^Y representa un grupo protector adecuado).

El **3A** monomérico es un derivado del ácido nitrobenzoico. Muchos de tales derivados están comercializados y otros pueden sintetizarse mediante métodos convencionales (por ejemplo, Althuis, T. H. y Hess, H. J., J Medicinal Chem., 20(1), 146-266 (1977)). A menudo, el ácido nitrobenzoico se deriva del éster, por hidrólisis de éster en condiciones suaves (como con LiOH). El **3A** dimérico se puede preparar mediante diversas estrategias divulgadas en la técnica anterior (por ejemplo, Esquema 3 del documento WO 00/12508). Por ejemplo, los ésteres de ácido benzoico apropiados pueden dimerizarse alrededor de un diol adecuado mediante eterificación de Mitsunobo, seguido de nitración e hidrólisis. Como alternativa, los ésteres del ácido benzoico pueden dimerizarse alrededor de un dihaluro adecuado mediante síntesis de éter de Williamson. Otras transformaciones requeridas para producir **3A** monoméricos y diméricos están disponibles en la bibliografía.

El material de partida de azetidina se puede sintetizar mediante modificación de las síntesis de prolina comparables divulgadas en la técnica anterior (por ejemplo, Esquema 4 del documento WO 00/12508). También se conocen en la literatura estrategias relacionadas específicamente con la azetidina (p. ej., Bose, D.S., *et al.*, Tetrahedron Letters, 38(33), 5839-5842, 1997; doi: 10.1016/S0040-4039(97)01297-5). Por ejemplo, el ácido azetidin-2-carboxílico comercializado, puede protegerse en el nitrógeno de la azetidina mediante un grupo protector adecuado, como Cbz, antes de la esterificación ácida para lograr el éster metílico. El éster se puede reducir con $LiBH_4$ en THF para producir 2-(hidroximetil)azetidina protegida con Cbz. En algunas estrategias, un grupo protector apropiado ($Prot^O$), tal como TBS, se puede añadir al alcohol mediante reacción con TBS-Cl. En otras estrategias, el alcohol queda desprotegido. En el esquema 3, $Prot^O$ puede representar un grupo protector adecuado o H; un grupo $Prot^O$ adecuado debe poder resistir las condiciones de reducción de NO_2. Seguidamente, se elimina el grupo protector de nitrógeno, normalmente por reducción en gas H_2, para producir el material de partida de azetidina requerido en el Esquema 3.

El compuesto **3A** se condensa con el material de partida azetidina para producir **3B**. A menudo, la condensación se logra mediante un acoplamiento DCC o mediante un cloruro de ácido (formado a partir del ácido carboxílico con cloruro de oxalilo o $SOCl_2$), o con HOBt en DCM a baja temperatura.

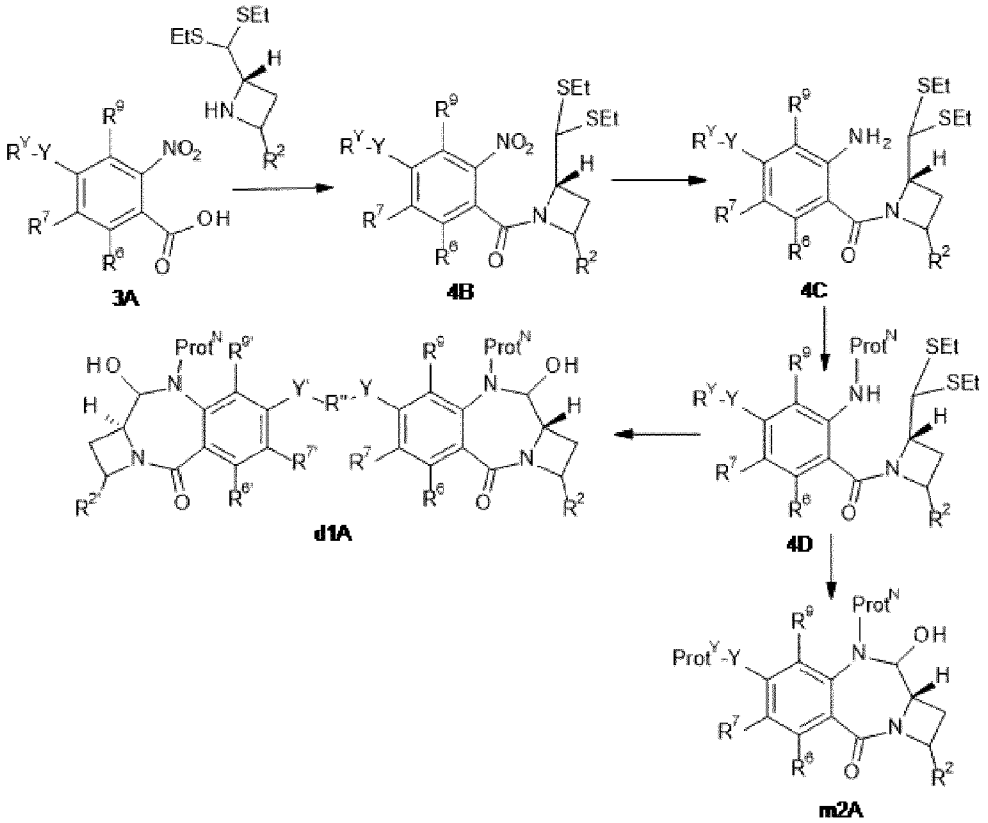
El grupo nitro de **3B** se reduce a la amina **(3C)**, utilizando procedimientos estándar tal como $SnCl_2$ en MeOH, o Zinc en $MeOH/H_2O$/ácido fórmico (90:5:5), o ditionito de sodio, o níquel Raney e hidrazina, o hidrogenación catalítica sobre paladio en carbón. El método seleccionado depende de los requisitos del grupo protector de hidroxilo.

La amina resultante está protegida individualmente por un grupo protector adecuado para proporcionar **3D**. El grupo

N-Prot^N es preferentemente un carbamato, como N-Alloc. La nucleofilicidad de la amina se reduce tras la protección con Alloc, por lo que se favorece la protección singular. Normalmente, esto se logra mediante reacción con piridina y un equivalente de cloroformiato de alilo. Cuando Prot^O es H, entonces **3D** es equivalente a **3E**. Cuando Prot^O es un grupo protector, este se elimina para dar el alcohol **3E** en condiciones estándar. Si Prot^O es un grupo protector de acetato que puede eliminarse en condiciones básicas suaves (por ejemplo, K_2CO_3), o si Prot^O es un grupo protector de éter sililo, tal como TBS, se puede eliminar usando TBAF o ácido suave.

El cierre del anillo oxidativo mediante el aldehído, o un equivalente funcional, del **3E** dimérico produce **d1A** (para una reacción adicional según el Esquema 1) y del **3E** monomérico produce **m2A** (para una reacción adicional según el Esquema 2). La oxidación selectiva de alcohol-aldehído se puede lograr mediante exposición a perrutenato de tetrapropilamonio (TPAP) en N-óxido de N-metilmorfolina (NMO) sobre tamices moleculares, o mediante oxidación de Swern (con DMSO y cloruro de oxalilo), o mediante oxidación de Dess-Martin (con DMP) o preferentemente mediante oxidación por radicales Cu(I)/TEMPO (con triflato de tetrakisacetonitrilo de cobre(I), 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), 1-metilimidazol y 2-(2-piridil)piridina). Se prefiere este última porque no requiere condiciones anhidras rigurosas y no hay evidencia de sobreoxidación de la especie ABD dilactama. La especie de aldehído sufre un cierre espontáneo del anillo B que implica el ataque del mismo por parte de la posición N10 protegida individualmente.

Una ruta alternativa al dímero **d1A** y al monómero **m2A** se ilustra en el Esquema 4. Esta ruta utiliza el desenmascaramiento de aldehídos para mediar en el cierre del anillo.



Esquema 4

Los compuestos **3A, 4B, 4C** y **4D** pueden ser diméricos (donde el grupo R^Y representa R" conectado a un precursor de ABD similar) o monomérico (donde el grupo R^Y representa un grupo protector adecuado).

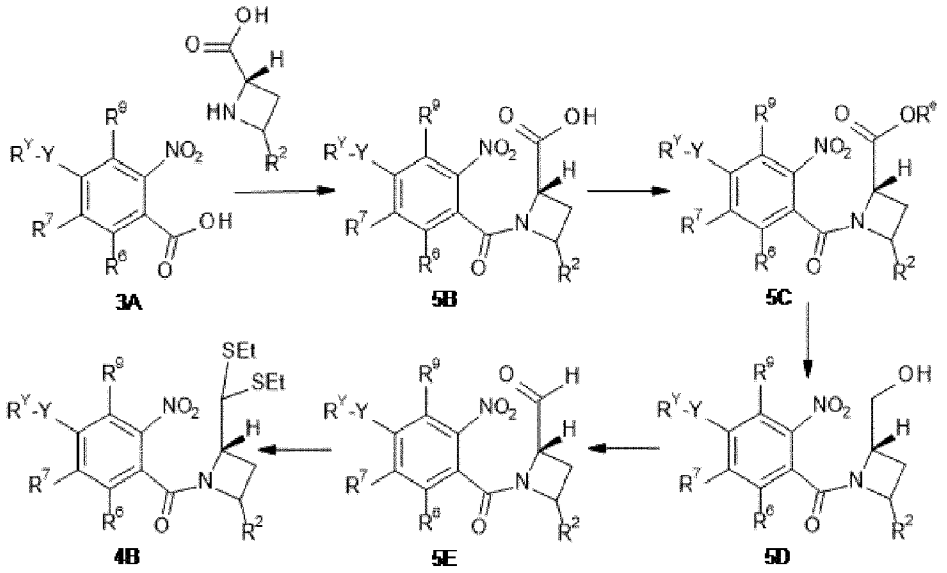
3A Se pueden generar variantes de monómeros y dímeros mediante las estrategias analizadas anteriormente, en relación con el Esquema 3. El material de partida de azetidina presenta un tioacetal en la posición 2 (aunque se pueden usar otros equivalentes de aldehído enmascarados). La dietil tioacetal azetidina se puede preparar mediante la modificación de estrategias sintéticas de prolina similares (por ejemplo, Langley, D.R. y Thurston, D. E., J Organic Chemistry, 52, 91-97 (1987)). También se conocen en la bibliografía rutas pertenecientes específicamente a la azetidina (p. ej., Bose, D.S., *et al.*, Tetrahedron Letters, 38(33), 5839-5842, 1997; doi: 10.1016/S0040-4039(97)01297-5). Por ejemplo, La 2-(hidroximetil)azetidina protegida con Cbz se puede preparar como se ha descrito anteriormente (para el Esquema 3). A continuación, el alcohol normalmente se reoxida al aldehído mediante oxidación de Dess-Martin (con DMP) o IBX en DMSO. El aldehído resultante se condensa preferentemente con un tiol tal como EtSH, con un catalizador ácido suave, tal como TMSCl en disolvente prótico, para conseguir el tioacetal. El tioacetal es

incompatible con la reducción de gas H_2, por lo que el grupo protector de N (por ejemplo, Cbz) a menudo se elimina con TMS-I en DCM. Esto da como resultado el material de partida dietil tioacetal azetidina.

La condensación directa de **3A** con el material de partida tioacetal azetidina produce **4B**. El grupo nitro de **4B** puede reducirse a la amina **(4C)** a través de los métodos descritos anteriormente en relación con el Esquema 3, preferentemente por el método del cloruro de estaño (II) ($SnCl_2$ en MeOH) o Zinc en MeOH/H_2O/ácido fórmico (90:5:5). Preferentemente, la reducción no se realiza mediante hidrogenación directa debido a la incompatibilidad del grupo tioacetal. La amina está protegida individualmente por un grupo protector de amina adecuado, tal como Alloc, por reacción con el correspondiente cloroformiato o cloruro de ácido. El grupo N-Prot^N de **4D** es preferentemente un carbamato, como N-Alloc, ya que estas especies se ven favorecidas por la protección única.

El desenmascaramiento selectivo del tioacetal al aldehído da como resultado la ciclación espontánea del anillo B, por ataque del mismo por la posición N10 individualmente protegida. Normalmente, el desenmascaramiento está mediado por Mercurio(II), por ejemplo $HgCl_2$ con $CaCO_3$ en acetonitrilo:agua. Para el **4D** dimérico esto proporciona **d1A** (para una reacción adicional según el Esquema 1) y para el **4D** monomérico esto proporciona **m2A** (para una reacción adicional según el Esquema 2).

El tioacetal dimérico o monomérico **4B** (según el Esquema 4) se puede sintetizar a través de una ruta alternativa, como se ilustra en el Esquema 5. Esta ruta genera el tioacetal in situ.



Esquema 5

Las estrategias sintéticas para lograr el **3A** monomérico y dimérico se han analizado anteriormente en relación con el Esquema 3. **3A** se condensa con ácido azetidin-2-carboxílico comercializado para producir **5B**. La ruta desde **5B** a **4B** sigue un enfoque similar al de la síntesis del material de partida tioacetal azetidina a partir del ácido azetidin-2-carboxílico (como se analiza en relación con el Esquema 4).

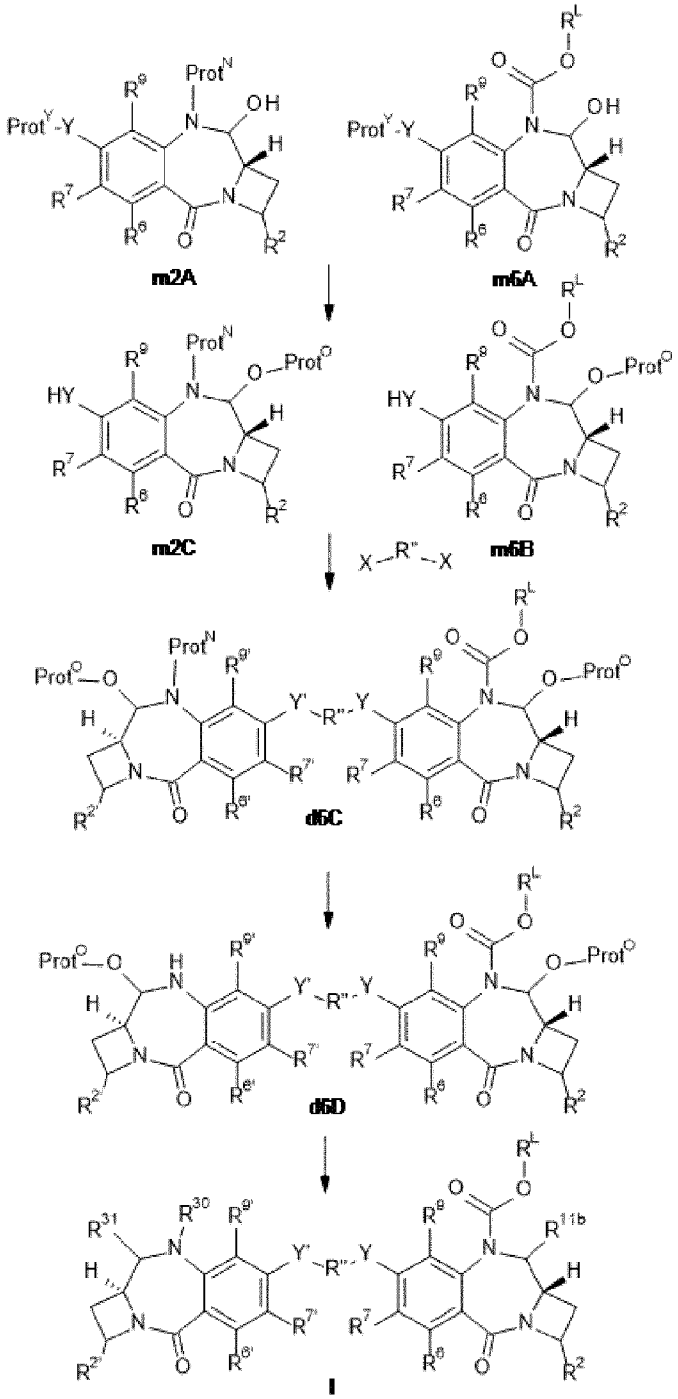
5C se reduce mediante un agente reductor de hidruro, normalmente por $LiBH_4$, al alcohol secundario **5D**. **5D** se reoxida a continuación al aldehído. **(5E),** a menudo por una especie de yodo hipervalente (por ejemplo, IBX o DMP). El tioacetal se genera in situ, preferentemente usando EtSH en condiciones ácidas, para proporcionar el compuesto **4B**. Este se puede hacer reaccionar aún más según el Esquema 4 para alcanzar la especie ABD deseada.

Síntesis de compuestos de fórmula I

Una posible etapa en la síntesis de los compuestos del segundo aspecto de la invención, particularmente el compuesto de fórmula I, se ilustra en el Esquema 6. Este comienza con dos monómeros ABD ciclados: **m2A** con una posición N10 protegida con Prot^N y **m6A** con un nitrógeno N10 añadido a R^L.

El compuesto de fórmula I puede existir en equilibrio entre la forma imina y la carbinolamina o éter de carbinolamina, dependiendo del disolvente utilizado (análogo al equilibrio ilustrado en el Esquema 1 para la Fórmula IV).

En algunas realizaciones, Prot^N puede ser equivalente al sustituyente R^{30} de fórmula I (descrito por la opción (d) i, ii y iii del segundo aspecto de la invención).



Esquema 6

El material de partida **m2A** puede prepararse según los esquemas 3, 4 y 5. Para compuestos donde $Prot^N$ es equivalente a los grupos enlazadores de carbamato R^{30}, **m2A** se prepara entonces a través del isocianato (es decir, la misma ruta que **m6A** - analizada más adelante).

m2A y **m6A** pueden dimerizarse alrededor de la posición Y8 con un enlazador de dímero R", utilizando una estrategia similar a la descrita en relación con el Esquema 2. El alcohol en posición C11 está protegido por $Prot^O$, donde $Prot^O$ es preferentemente TBS y se introduce mediante reacción con TBS-Cl. La posterior eliminación del grupo $Prot^Y$, donde $Prot^Y$ es TIPS, puede ocurrir con LiOAc en DMF y agua, para producir **m2c** y **m6B** respectivamente.

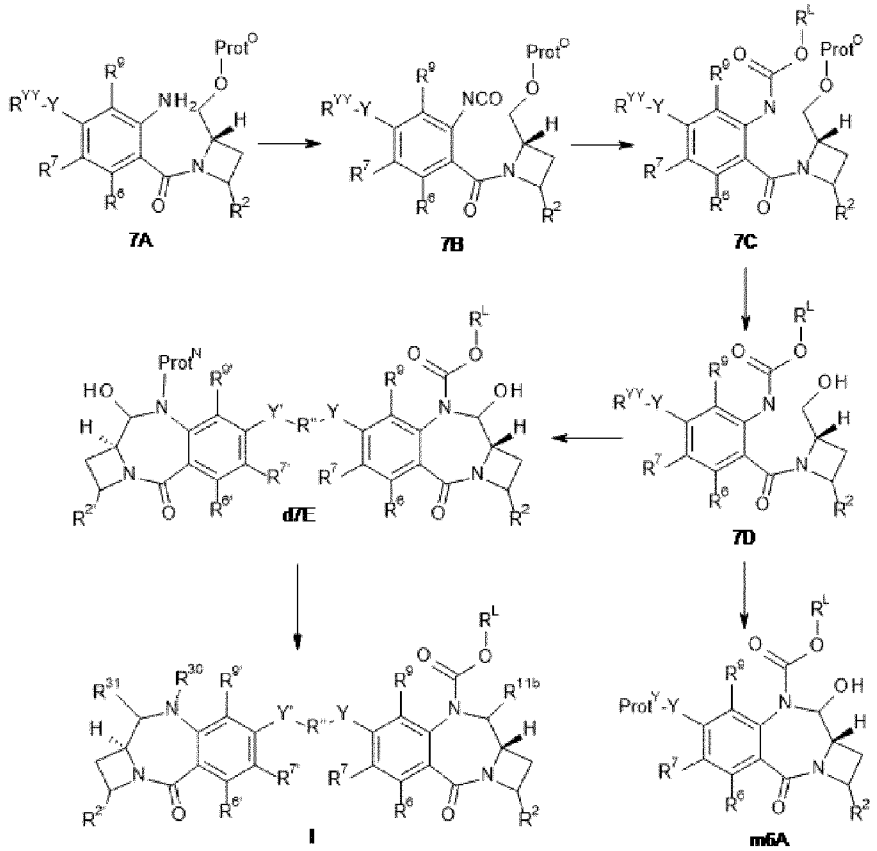
m2c y **m6B** se hacen reaccionar aún más con $R"(X)_2$ para producir el dímero **d6C**. Normalmente, Y es O y X es un halógeno (preferentemente Br). En este caso, el aditivo TBAI puede impulsar una doble síntesis de éter Williamson para formar el dímero. También se conocen en la técnica estrategias alternativas para la dimerización, por ejemplo, mediante eterificación de Mitsonobu.

En algunas realizaciones, el grupo protector N10 se elimina del ABD no enlazador para producir el dímero asimétrico **d6D**. Se analizan varias estrategias de desprotección en relación con los Esquemas 1 y 2. En los casos donde $Prot^N$ es Alloc, entonces la desprotección podrá realizarse con paladio.

En otras realizaciones, el grupo protector N10 no se elimina. **d6C** se transforma directamente en un compuesto de fórmula I mediante la eliminación de $Prot^O$.

La eliminación de los grupos protectores del alcohol en la posición C11 proporciona el compuesto asimétrico de fórmula I. Si $Prot^O$ es TBS, la desprotección del alcohol puede ocurrir concomitantemente con la desprotección de la posición Alloc N10 con paladio y pirrolidina en DCM.

Una posible síntesis de monómero **m6A** (requerido para el Esquema 6) y una ruta alternativa a los compuestos de fórmula I se ilustran en el Esquema 7.



Esquema 7

Los compuestos **7A, 7B, 7C** y **7D** pueden ser diméricos (donde el grupo R^{YY} representa R" conectado a un precursor de ABD individualmente protegido en la posición N10) o monoméricos (donde el grupo R^{YY} representa un grupo protector adecuado). El **7A** monomérico es equivalente al **3C** monomérico y se puede sintetizar mediante una ruta similar (como se ilustra en el Esquema 3).

La amina de **7A** se transforma en el isocianato **7B**. Las estrategias para la formación de isocianato se detallan en la técnica anterior (por ejemplo, en el documento WO 2005/023814). Normalmente, se utiliza fosgeno, preferentemente trifosgeno en condiciones básicas; los cristales sólidos de trifosgeno son más seguros y fáciles de manipular que el gas fosgeno tóxico. La reacción debe llevarse a cabo en un disolvente orgánico anhidro y no hidroxílico, que es preferentemente no polar. Los disolventes adecuados incluyen DCM anhidro y tolueno anhidro. La reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y se controla convenientemente mediante espectroscopia infrarroja a aproximadamente 2265 cm^{-1}.

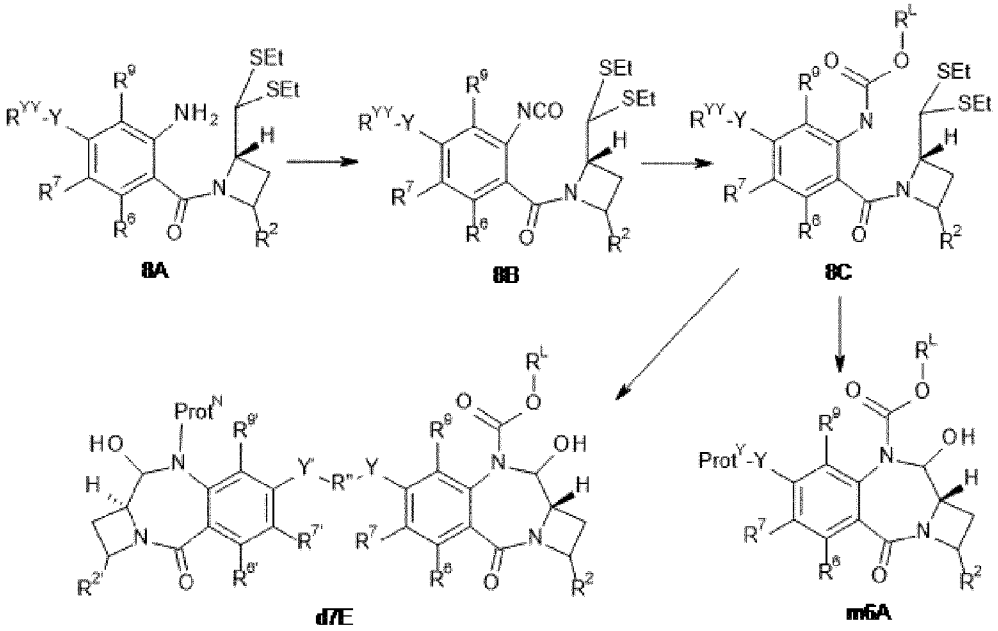
El carbamato **7C** se forma a partir del isocianato mediante el ataque del mismo por R^L-OH. La formación de carbamato a menudo se logra mediante el método de una sola etapa, donde el isocianato está formado por trifosgeno con TEA en DCM y R^L-OH se añade directamente a la mezcla de reacción. Este enfoque reduce el tiempo de residencia del isocianato antes de la formación del carbamato, lo que disminuye la posibilidad de reacciones secundarias.

El grupo protector $Prot^O$ se elimina mediante un método adecuado para proporcionar el alcohol secundario **7D**, normalmente en condiciones ácidas (por ejemplo, ácido acético en disolvente de THF:agua).

El cierre de anillo oxidativo de **7D** a través del aldehído, o un equivalente funcional, se puede lograr mediante exposición a perrutenato de tetrapropilamonio (TPAP) en N-óxido de N-metilmorfolina (NMO) sobre tamices moleculares, o mediante oxidación de Swern (DMSO y cloruro de oxalilo), o preferentemente mediante oxidación por radicales Cu(I)/TEMPO (triflato de tetrakisacetonitrilo de cobre(I), 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina (TEMPO), 1-metilimidazol y 2-(2-piridil)piridina). Esto produce **m6A** (para una reacción adicional en el Esquema 6) para la variante de **7D** monomérica (es decir, donde R^{YY} = $Prot^Y$), o produce **d7E** para la variante **7D** dimérica (es decir, donde R^{YY} = R" conectado a un ABD protegido en N10).

La eliminación del grupo protector de nitrógeno ($Prot^N$), normalmente Alloc eliminado con paladio, proporciona el compuesto asimétrico de fórmula I.

Una ruta alternativa al monómero. **m6A** (Esquema 6) y al dímero **d7E** (Esquema 7) se ilustra en el Esquema 8.



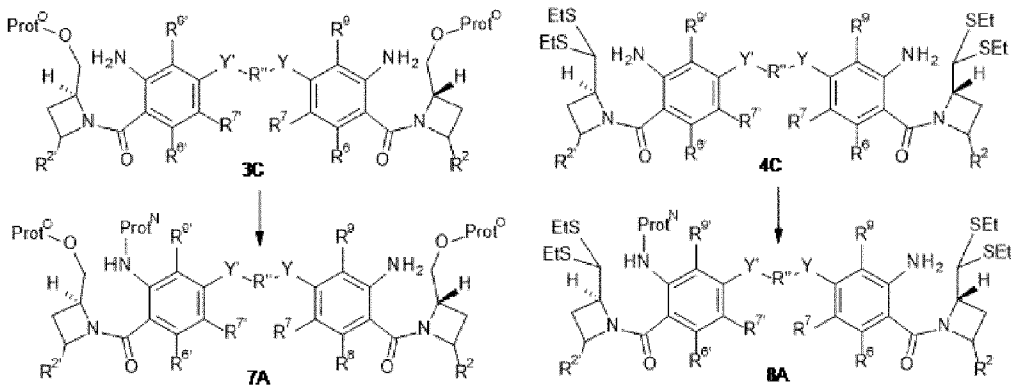
Esquema 8

Los compuestos **8A, 8B** y **8C** pueden ser diméricos (donde el grupo R^{YY} representa R" conectado a un precursor de ABD individualmente protegido en la posición N10) o monoméricos (donde el grupo R^{YY} representa un grupo protector adecuado, $Prot^Y$). **8A** se transforma en el isocianato **8B**, que a su vez reacciona con R^L-OH para añadir R^L mediante un carbamato. La estrategia preferida es similar a la analizada en relación con el Esquema 7.

El desenmascaramiento selectivo del tioacetal. **8C** al aldehído da como resultado la ciclación espontánea del anillo B, por ataque del mismo por la posición N10 individualmente protegida. Normalmente, el desenmascaramiento está mediado por Mercurio(II), por ejemplo $HgCl_2$ con $CaCO_3$ en acetonitrilo:agua. La ciclación proporciona **m6A** monomérico (a partir del **8C** monomérico) y **d7E** dimérico (a partir del **8C** dimérico). **m6A** puede reaccionar según el Esquema 6 y **d7E** según el Esquema 7 para producir compuestos de fórmula I.

Los materiales de partida del Esquema 7 se pueden obtener mediante una ruta similar al Esquema 3 (**3A** a **3C** monomérico) para el **7A** monomérico (es decir, donde R^{YY} es $Prot^Y$). Análogamente, los materiales de partida del Esquema 8 se pueden obtener a través de una ruta similar al Esquema 4 (**3A** a **4C** monomérico) para el **8A** monomérico (es decir, donde R^{YY} es $Prot^Y$).

Una ruta para **7A** y **8A** diméricos (es decir, donde R^{YY} es R" conectado a un precursor de ABD protegido individualmente en la posición N10) se ilustra en el Esquema 9.



Esquema 9

Las variantes diméricas de **3C** y **4C** se generan a través de las estrategias analizadas en los Esquemas 3, 4 y 5. **3C** y **4C** están protegidos en una sola posición N10 para producir los dímeros de ABD asimétricos **7A** y **8A** respectivamente. Esto se logra mediante la adición de un equivalente de reactivo protector, normalmente cloroformiato de alilo cuando $Prot^N$ es Alloc, y posterior purificación para eliminar productos no protegidos o doblemente protegidos.

Síntesis de conjugados de fórmula II

Una posible etapa en la síntesis de los conjugados del tercer aspecto de la invención, particularmente la unidad de enlazador (D^L) constituyente de fórmula II, implica la conexión del enlazador a una unidad de ligando, convirtiendo así el grupo R^L (según los compuestos de fórmula I) en el grupo R^{LL} (según los compuestos de fórmula I').

Los conjugados se pueden preparar como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos pueden conjugarse con el compuesto enlazador de fármaco generalmente como se describe en Doronina *et al.*, Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Brevemente, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS que contiene borato de sodio 50 mM a pH 7,4 se reducen con clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. El progreso de la reacción, que reduce los disulfuros entre cadenas, se controla por reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se deja avanzar hasta que se consigue el nivel deseado de tioles/mAb. El anticuerpo reducido se enfría a 0 °C y se alquila con 1,5 equivalentes de enlazador de enlazador de fármaco de maleimida por tiol de anticuerpo. Después de 1 hora, la reacción se interrumpió mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El enlazador de fármaco inactivado se elimina por filtración en gel sobre una columna de PD-10. El ADC se filtra luego en condiciones estériles a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La concentración de proteína puede determinarse por análisis espectral a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con corrección por la contribución de la absorbancia del fármaco a 280 nm. Puede utilizarse cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el grado de agregación de los anticuerpos, y puede utilizarse RP-HPLC para determinar los niveles de enlazador de fármaco remanentes inactivado por NAC.

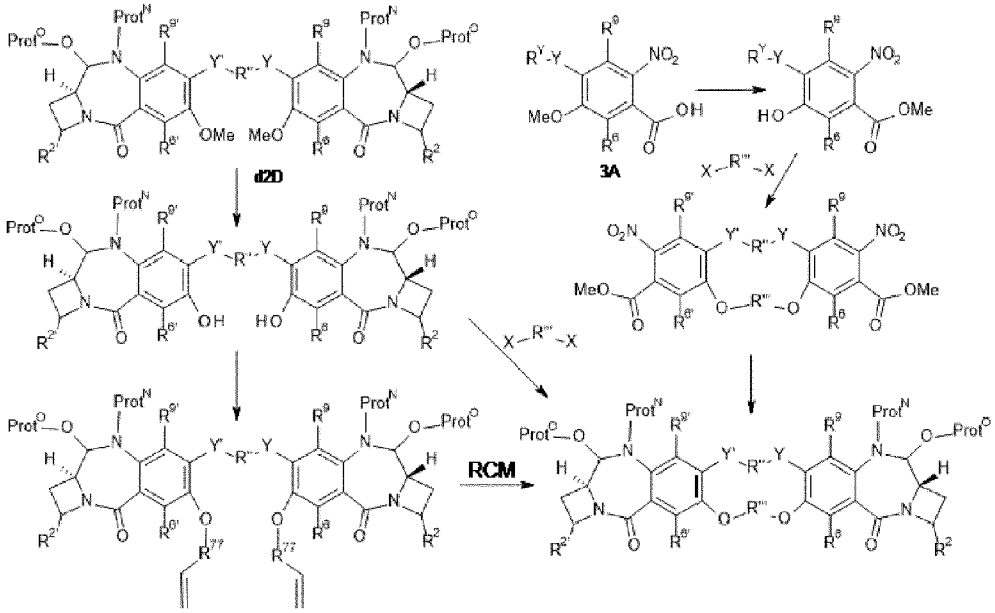
Síntesis de realizaciones macrocíclicas

En algunas realizaciones del primer, segundo o tercer aspectos de la invención, los sustituyentes R^7 y $R^{7'}$ pueden formar juntos un grupo que es: (i) $-O-(CH_2)_n-O-$ donde n es de 7 a 16 o (ii) $-O-(CH_2CH_2O)_m-$ donde m es de 2 a 5, para dar un dímero de ABD macrocíclico.

Se pueden emplear varias estrategias para introducir un enlazador R^7-$R^{7'}$, como se ilustra en el Esquema 10 a continuación. Partiendo de **d2D,** donde R^7 y $R^{7'}$ ambos representan -OR, el grupo R puede eliminarse mediante la adición de BBr_3 en DCM para revelar el alcohol. Una reacción de sustitución de un dibromoalcano en base, como 1,7-dribromoheptano con K_2CO_3, produce el producto macrocíclico por ataque del mismo por ambos alcoholes en posición C7.

Una ruta alternativa que comienza en **d2D** implica sustituir el alcohol en posición C7 por un n-bromoalqu-1-eno. Esto proporciona dos cadenas alquenilo terminalmente insaturadas, que pueden sufrir fácilmente metátesis de cierre de anillo (RCM). Por ejemplo, la sustitución se puede lograr con 5-bromopent-1-eno y RCM con catalizador Grubs-II. La macrociclación mediante RCM es generalmente de alto rendimiento.

Una ruta preferida para el macrociclo comienza en el **3A** dimérico o un precursor de éster, donde R^7 y $R^{7'}$ representan ambos -OR. La eliminación del grupo R y la sustitución por un dibromoalcano (usando condiciones similares a las anteriores) proporciona un compuesto macrocíclico. El ABD se podrá obtener entonces según los esquemas 3 o 4.



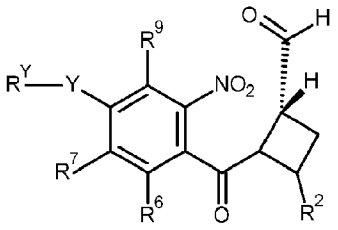
Esquema 10

El producto resultante se puede hacer reaccionar mediante el Esquema 2 o el Esquema 6 para conseguir los compuestos de fórmula IV y I respectivamente.

En la bibliografía se encuentran más detalles de la transformación necesarios para producir tales productos macrocíclicos (Donnell, A.F., Zhang, Y., Stang, E.M., Wei, D.D., Tebben, A.J., Perez, H.L., Schroeder, G.M., Pan, C., Rao, C., Borzilleri, R.M., Vite, G.D., Gangwar, S., Macrocyclic pyrrolobenzodiazepine dimers as antibody-drug conjugate payloads, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2017), doi: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.028 y el documento WO 2016/209951).

Síntesis de realizaciones de amina secundaria

Los compuestos donde el grupo N10-C11 es -NH-CH_2- (es decir, aminas secundarias) pueden sintetizarse mediante una modificación de los procedimientos anteriores. En particular, la aminación reductora del compuesto 3B* puede producir una versión modificada de **m2A** o **d1A** para usar en las etapas siguientes:



3B*

Los compuestos 3B* pueden sintetizarse a partir de un alcohol precursor mediante oxidación, siendo alcanzable el alcohol precursor mediante etapas análogas a las utilizadas para sintetizar **3B**.

Síntesis de conjugados de fármacos

Los conjugados se pueden preparar como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos pueden conjugarse con el compuesto enlazador de fármaco generalmente como se describe en Doronina *et al.*, Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Brevemente, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS que contiene borato de sodio 50 mM a pH 7,4 se reducen con clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. El progreso de la reacción, que reduce los disulfuros entre cadenas, se controla por reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se deja avanzar hasta que se consigue el nivel deseado de tioles/mAb. El anticuerpo reducido se enfría a 0 °C y se alquila con 1,5 equivalentes de enlazador de enlazador de fármaco de maleimida por tiol de anticuerpo. Después de 1 hora, la reacción se interrumpió mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El enlazador de fármaco inactivado se elimina por filtración en gel sobre una columna de PD-10. El ADC se filtra luego en condiciones estériles a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. La concentración de proteína puede determinarse por análisis espectral a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con

corrección por la contribución de la absorbancia del fármaco a 280 nm. Puede utilizarse cromatografía de exclusión por tamaño para determinar el grado de agregación de los anticuerpos, y puede utilizarse RP-HPLC para determinar los niveles de enlazador de fármaco remanentes inactivado por NAC.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto sobre el crecimiento de una línea celular tumoral cuando se trata con un control o con un conjugado de la presente invención.

Preferencias adicionales

Las siguientes preferencias pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención como se han descrito anteriormente, o pueden referirse a un único aspecto. Las preferencias pueden combinarse entre sí en cualquier combinación.

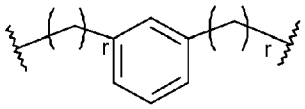
$R^{6'}$ y $R^{9'}$ se seleccionan de los mismos grupos que R^6 y R^9 respectivamente. En algunas realizaciones, $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$ e Y' son los mismos que R^6, R^7, R^9 e Y, respectivamente.

Enlace del dímero

En algunas realizaciones, Y e Y' son ambas O.

En algunas realizaciones, R" es un grupo alquileno C_{3-7} sin sustituyentes. En algunas de estas realizaciones, R" es un alquileno C_3, C_5 o C_7. En particular, R" puede ser un alquileno C_3 o C_5.

En otras realizaciones, R" es un grupo de fórmula:



donde r es 1 o 2.

El grupo fenileno puede estar reemplazado por un grupo piridileno.

R^6 a R^9

En algunas realizaciones, R^9 es H.

En algunas realizaciones, R^6 se selecciona de H, OH, OR, SH, NH_2, nitro y halo, y puede seleccionarse de H o halo. En algunas de estas realizaciones R^6 es H.

En algunas realizaciones, R^7 se selecciona de H, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR' y halo. En algunas de estas realizaciones R^7 se selecciona de H, OH y OR, donde R se selecciona de grupos alquilo C_{1-7}, heterociclilo C_{3-10} y arilo C_{5-10} opcionalmente sustituidos. R puede ser más preferentemente un grupo alquilo C_{1-4}, que puede estar sustituido o no. Un sustituyente de interés es un grupo arilo C_{5-6} (por ejemplo, fenilo). Los sustituyentes particularmente preferidos en las posiciones 7 son OMe y OCH_2Ph. Otros sustituyentes de particular interés son dimetilamino (es decir $-NMe_2$); $-(OC_2H_4)_qOMe$, donde q es de 0 a 2; heterociclilos C_6 que contienen nitrógeno, incluyendo morfolino, piperidinilo y N-metil-piperazinilo.

Estas realizaciones y preferencias también se aplican a $R^{9'}$, $R^{6'}$ y $R^{7'}$ respectivamente.

En otras realizaciones, R^7 y $R^{7'}$ juntos forman un grupo que es $-O-(CH_2)_n-O-$, donde n es de 7 a 16. n puede ser al menos 7, 8, 9, 10 u 11. N puede ser como máximo 16, 15, 14 o 13.

En otras realizaciones, R^7 y $R^{7'}$ juntos forman un grupo que es $-O-(CH_2CH_2O)_m-$, donde m es de 2 a 5. m puede ser al menos 2, 3 o 4. m puede ser como máximo 5, 4 o 3.

R^{10}, R^{11}, R^{20}, R^{21} (Fórmula IV)

En algunas realizaciones, R^{10} y R^{11} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos. En algunas de estas realizaciones, R^{20} y R^{21} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos. En otra de estas realizaciones, R^{20} y R^{21} son ambos H.

En algunas realizaciones, R^{10} es H y R^{11} se selecciona de OH y OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}. En algunas de estas realizaciones, R^{20} es H y R^{21} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}. En otra de estas realizaciones, R^{20}

y R^{21} son ambos H.

En algunas realizaciones, R^{10} y R^{11} son ambos H. En algunas de estas realizaciones, R^{20} y R^{21} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos. En otra de estas realizaciones, R^{20} es H y R^{21} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}.

En algunas realizaciones, R^A es metilo. En algunas realizaciones, R^B es metilo.

En algunas realizaciones, solo uno de los pares de R^{10} y R^{11} y R^{20} y R^{21} son ambos H. En otras realizaciones, ninguno de los pares de R^{10} y R^{11} y R^{20} y R^{21} son ambos H.

En algunas realizaciones, R^{10}, R^{11}, R^{20} y R^{21} son todos H.

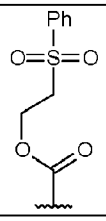
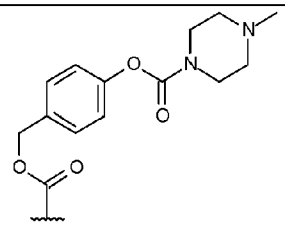
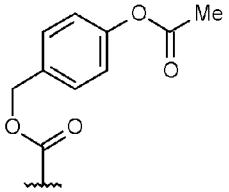
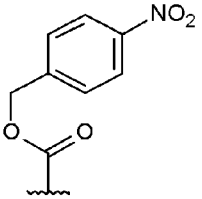
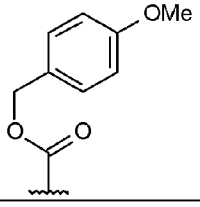
N10'-C11' (Fórmulas I e I)*

En algunas realizaciones, R^{30} y R^{31} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos.

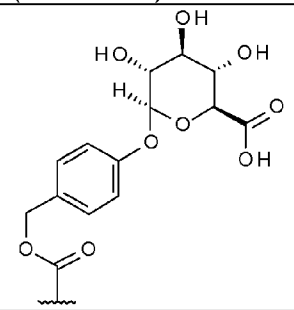
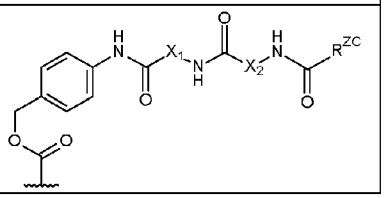
En algunas realizaciones, R^{30} es H y R^{31} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}. En algunas de estas realizaciones, R^B es metilo.

En algunas realizaciones, R^{30} es H y R^{31} es H.

En algunas realizaciones, R^{31} es OH u OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4} y R^{30} se selecciona de:

R^{30a}	
R^{30b}	
R^{30c}	
R^{30d}	
R^{30e}	
R^{30f}	

(continuación)

R^{30g}	
R^{30h}	

-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH- representa un dipéptido. Los aminoácidos del dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales. El dipéptido puede ser el sitio de acción para la escisión mediada por catepsina.

En una realización, el dipéptido, -C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-, se selecciona de:

- Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- Ala-Lis-,
- Val-Cit-,
- Fe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Iso-Cit-,
- Phe-Arg-,
- Trp-Cit-

donde Cit es citrulina.

Preferentemente, el dipéptido, -C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-, se selecciona de:

- Fe-Lis-,
- Val-Ala-,
- Val-Lis-,
- Ala-Lis-,
- Val-Cit-.

Lo más preferentemente, el dipéptido, -C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-, es -Fe-Lis- o -Val-Ala-.

Se pueden usar otras combinaciones de dipéptidos, incluyendo los descritos por Dubowchik *et al,* Bioconjugate Chemistry, 2002, 13855-869.

En una realización, la cadena lateral aminoacídica está derivatizada, cuando sea apropiado. Por ejemplo, un grupo amino o grupo carboxi de una cadena lateral aminoacídica puede estar derivatizado.

En una realización, un grupo amino NH_2 de un aminoácido de la cadena lateral, tales como lisina, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en NHR y NRR'.

En una realización, un grupo carboxi COOH de un aminoácido de la cadena lateral, tal como ácido aspártico, es una forma derivatizada seleccionada del grupo que consiste en COOR, $CONH_2$, CONHR y CONRR'.

En una realización, la cadena lateral aminoacídica está protegida químicamente, cuando sea apropiado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo como se ha tratado anteriormente. Los presentes inventores han establecido que las secuencias de aminoácido protegidas son escindibles por enzimas. Por ejemplo, se ha establecido que una secuencia dipeptídica que comprende un residuo de Lis protegido por una cadena lateral Boc, es escindible con catepsina.

Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se describen en el catálogo de Novabiochem. Otras estrategias de grupo protector se establecen en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene y Wuts.

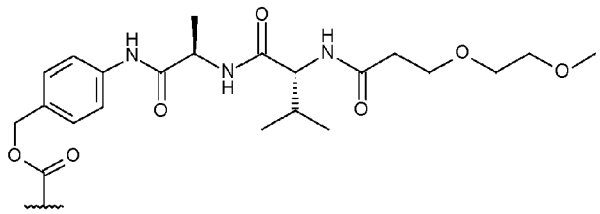
A continuación se muestran posibles grupos protectores de cadena lateral para aquellos aminoácidos que tienen una funcionalidad de cadena lateral reactiva:

Arg: Z, Mtr, Tos;
Asn: Trt, Xan;
Asp: Bzl, t-Bu;
Cys: Acm, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;
Glu: Bzl, t-Bu;
Gln: Trt, Xan;
His: Boc, Dnp, Tos, Trt;
Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;
Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;
Thr: Bz;
Trp: Boc;
Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

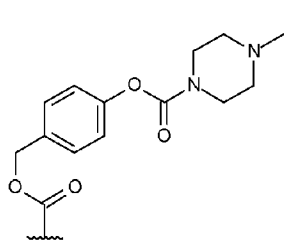
En una realización, la protección de la cadena lateral se selecciona para que sea ortogonal a un grupo proporcionado como, o como parte de, un grupo limitador, cuando esté presente. Así, la eliminación del grupo protector de la cadena lateral no elimina el grupo limitador o cualquier funcionalidad del grupo protector que sea parte del grupo limitador.

En otras realizaciones de la invención, los aminoácidos seleccionados son aquellos que no tienen una funcionalidad de cadena lateral reactiva. Por ejemplo, los aminoácidos pueden seleccionarse de: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro y Val.

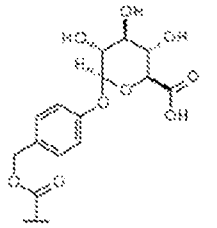
En la presente invención se prefiere de manera particular, que si Q comprende un dipéptido, entonces -C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH- sea el mismo dipéptido. Un ejemplo de grupo preferido es:



Otros grupos R^{30} preferidos incluyen:



y



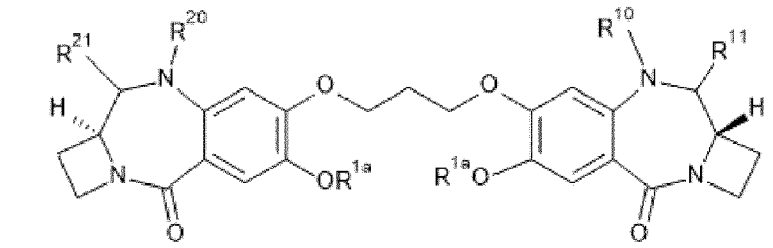
R^{11b} (Fórmulas I e I)*

En algunas realizaciones, R^{11b} es OH.

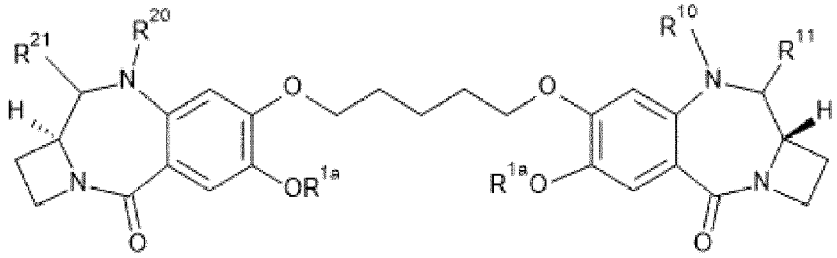
En algunas realizaciones, R^{11b} es O^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}. En algunas de estas realizaciones, R^A es metilo.

Otras fórmulas

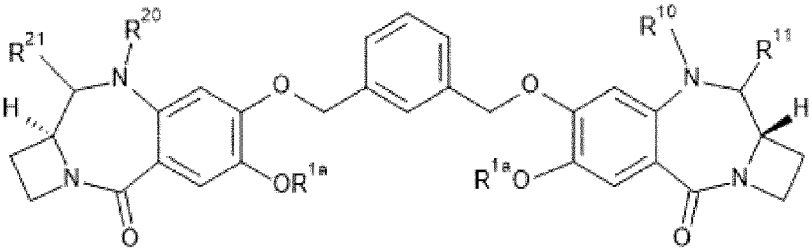
En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención son de fórmulas IVa, IVb o IVc:



IVa



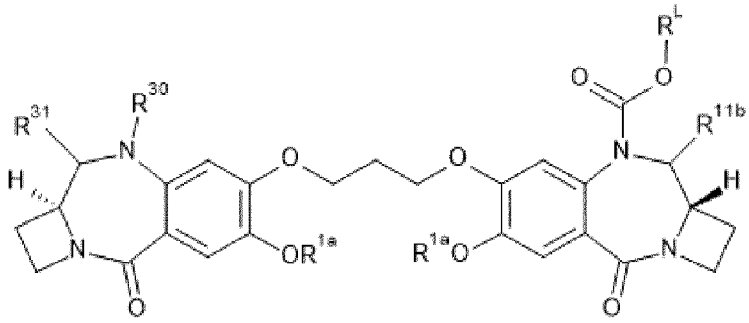
IVb



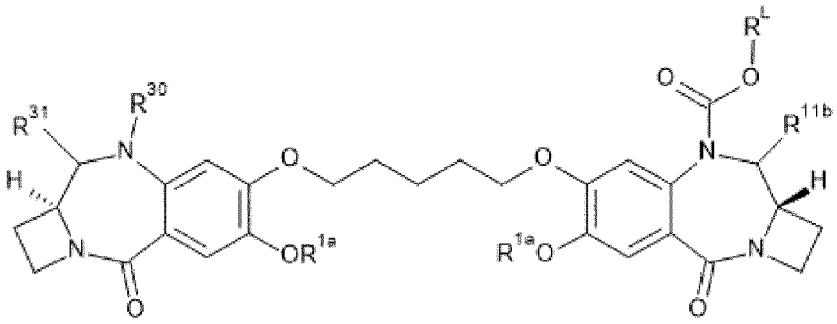
IVc

donde R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo;
R^{10}, R^{11}, R^{20} y R^{21} son como se han definido anteriormente.

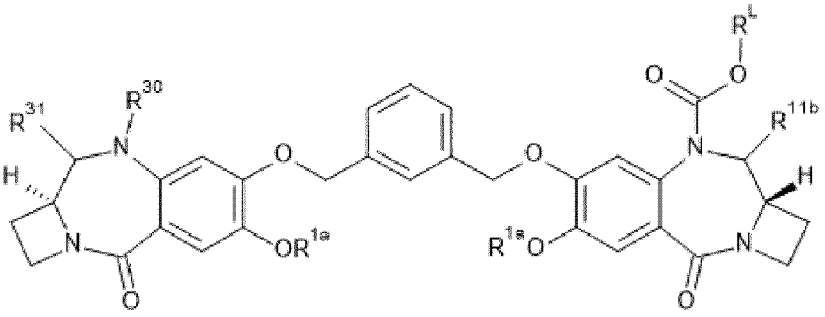
En algunas realizaciones del segundo aspecto de la presente invención son de fórmulas Ia, Ib o Ic:



Ia



Ib



Ic

donde R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo;
R^{30}, R^{31}, R^{L} y R^{11b} son como se han definido anteriormente.

Estas realizaciones y preferencias también se aplican al tercer aspecto de la invención.

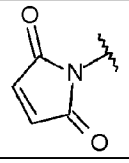
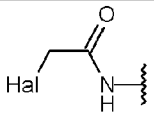
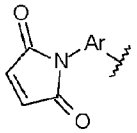
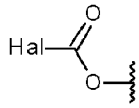
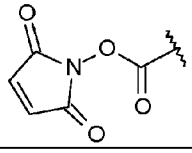
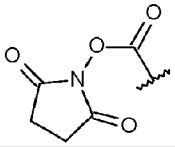
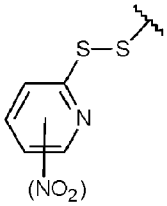
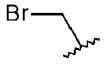
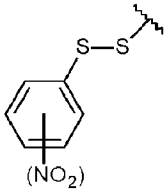
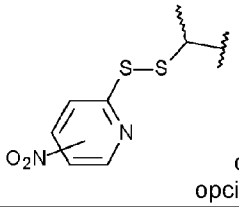
Enlazador (R^L)

En algunas realizaciones, R^L es de fórmula IIIa.

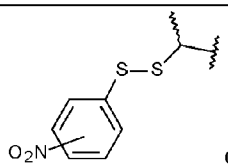
En algunas realizaciones, R^{LL} es de fórmula IIIa'.

GL

G^L puede seleccionarse de

(G^{L1-1})		(G^{L4})	 Donde Hal = I, Br, Cl
(G^{L1-2})		(G^{L5})	
(G^{L2})		(G^{L6})	
(G^{L3-1})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L7})	
(G^{L3-2})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L8})	
(G^{L3-3})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L9})	

(continuación)

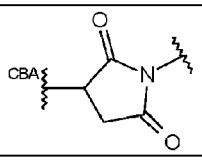
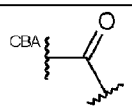
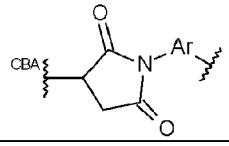
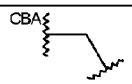
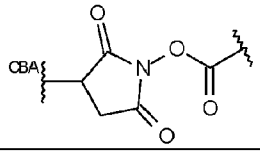
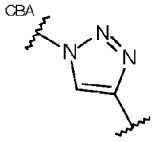
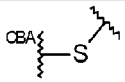
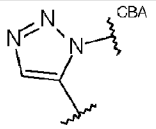
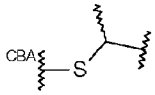
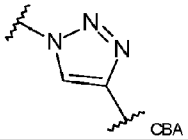
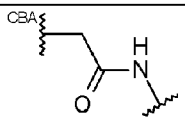
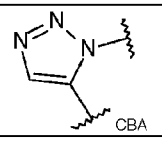
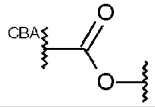
(G^{L3-4})	 donde el grupo NO_2 es opcional	

donde Ar representa fenileno.

En algunas realizaciones, G^L se selecciona de G^{L1-1} y G^{L1-2}. En algunas de estas realizaciones, G^L es G^{L1-1}.

G^{LL}

G^{LL} puede seleccionarse de:

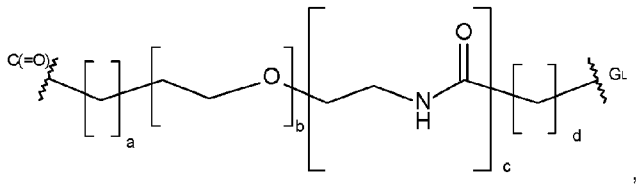
(G^{LL1-1})		(G^{LL6})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL7})	
(G^{LL2})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL4})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL5})			

donde Ar representa fenileno.

En algunas realizaciones, G^{LL} se selecciona de G^{LL1-1} y G^{LL1-2}. En algunas de estas realizaciones, G^{LL} es G^{LL1-1}.

X

X es:



,

donde a = de 0 a 5, b = de 0 a 16, c = 0 o 1, d = de 0 a 5.

a puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, a es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, a es 0 o 1. En realizaciones adicionales, a es 0.

b puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas realizaciones, b es de 0 a 12. En algunas de estas realizaciones, b es de 0 a 8, y puede ser 0, 2, 4 u 8.

c puede ser 0 o 1.

d puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas realizaciones, d es de 0 a 3. En algunas de estas realizaciones, d es 1 o 2. En realizaciones adicionales, d es 2.

En algunas realizaciones de X, a es 0, c es 1 y d es 2, y b puede ser de 0 a 8. En algunas de estas realizaciones, b es 0, 4 u 8.

Q

En una realización, Q es un residuo de aminoácido. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural.

En una realización, Q se selecciona de: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg y Trp, donde Cit es citrulina.

En una realización, Q comprende un residuo dipeptídico. Los aminoácidos del dipéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil de catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por la catepsina. El dipéptido es entonces un sitio de reconocimiento para la catepsina.

En una realización, Q se selecciona de:

^{CO}-Phe-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Ala-^{NH},

^{CO}-Val-LyS-^{NH},

^{CO}-Ala-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Cit-^{NH},

^{CO}-Phe-Cit-^{NH},

^{CO}-Leu-Cit-^{NH},

^{CO}-Ile-Cit-^{NH},

^{CO}-Phe-Arg-^{NH},

y

^{CO}-Trp-Cit-^{NH};

donde Cit es citrulina.

Preferentemente, Q se selecciona de:

^{CO}-Phe-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Ala-^{NH},

^{CO}-Val-Lys-^{NH},

^{CO}-Ala-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Cit-^{NH}.

Lo más preferentemente, Q se selecciona de ^{CO}-Phe-Lys-^{NH}, ^{CO}-Val-Cit-^{NH} y ^{CO}-Val-Ala-^{NH}.

Otras combinaciones de dipéptidos de interés incluyen:

^{CO}-Gly-Gly-^{NH},

^{CO}-Pro-Pro-^{NH},

y

^{CO}-Val-Glu-^{NH}.

Se pueden usar otras combinaciones de dipéptidos, incluyendo los descritos por Dubowchik *et al,* Bioconjugate Chemistry, 2002, 13855-869.

En algunas realizaciones, Q^X es un residuo de tripeptídico. Los aminoácidos del tripéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, el tripéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlazador lábil de catepsina, el tripéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por catepsina. El tripéptido es entonces un sitio de reconocimiento para catepsina. Los enlazadores de tripéptidos de particular interés son:

^{CO}-Glu-Val-Ala-^{NH}

^{CO}-Glu-Val-Cit-^{NH}

^{CO}-αGlu-Val-Ala-^{NH}

^{CO}-αGlu-Val-Cit-^{NH}

En una realización, la cadena lateral aminoacídica está protegida químicamente, cuando sea apropiado. El grupo protector de la cadena lateral puede ser un grupo como se analiza a continuación. Las secuencias de aminoácidos protegidas son escindibles por enzimas. Por ejemplo, una secuencia dipeptídica que comprende un residuo de Lis protegido con cadena lateral Boc es escindible mediante catepsina.

Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y se describen en el catálogo de Novabiochem, y como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, R^L es de fórmula IIIb.

En algunas realizaciones, R^{LL} es de fórmula IIIb'.

R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno.

En algunas realizaciones, ambos R^{L1} y R^{L2} son H.

En algunas realizaciones, R^{L1} es H y R^{L2} es metilo.

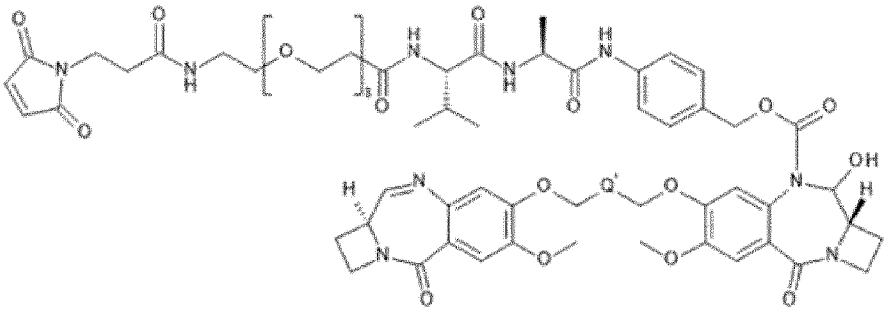
En algunas realizaciones, ambos R^{L1} y R^{L2} son metilo.

En algunas realizaciones, R^{L1} y R^{L2} junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno.

En algunas realizaciones, R^{L1} y R^{L2} junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclobutileno.

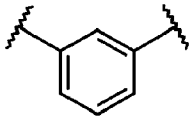
En el grupo IIIb, en algunas realizaciones, e es 0. En otras realizaciones, e es 1 y el grupo nitro puede estar en cualquier posición disponible del anillo. En algunas de estas realizaciones, está en la posición orto. En otras de estas realizaciones, está en la posición para.

En una realización particular, el segundo aspecto de la invención comprende un conjugado de fórmula Id:

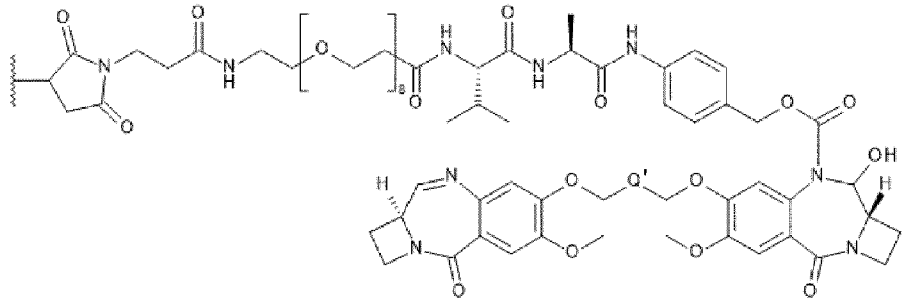


donde Q' se selecciona de:

(a) -CH_2-;
(b) -C_3H_6-; y
(c)

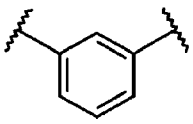


En una realización particular, el tercer aspecto de la invención, el enlazador de fármaco (D^L) es de fórmula (Id'):

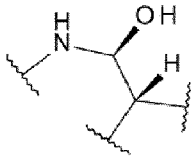


donde Q' se selecciona de:

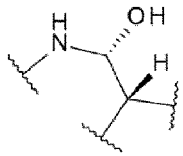
(a) -CH_2-;
(b) -C_3H_6-; y
(c)



En algunas realizaciones de la presente invención, el sustituyente C11 puede estar en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos vecinos:



En otras realizaciones, el sustituyente C11 puede estar en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos vecinos:



Ejemplos

Información general

La cromatografía instantánea manual se realizó utilizando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254. Los disolventes de extracción y cromatografía se adquirieron y usaron sin purificación adicional de Fisher Scientific, R. U. Todos los productos químicos se adquirieron en Aldrich, Lancaster o BDH. La cromatografía instantánea automatizada se realizó utilizando un Biotage Isolera 1™ usando elución en gradiente comenzando con 88 % de hexano/EtOAc o 99,9 % de DCM/MeOH hasta que todos los componentes activos frente a UV (detección a 214 y 254 nm) eluyeron de la columna. El gradiente se mantuvo manualmente siempre que se observara una elución sustancial de material activo frente a UV. Se comprobó la pureza de las fracciones mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254, con indicador fluorescente en placas de aluminio. La visualización de la TLC se realizó con luz ultravioleta o vapor de yodo, a menos que se indique otra cosa. Los disolventes de extracción y cromatografía se adquirieron y utilizaron sin purificación adicional en VWR R. U. Todos los productos de química fina se adquirieron en Sigma-Aldrich o TCI Europe, a menos que se indique otra cosa. Los reactivos pegilados se obtuvieron de Quanta biodesign US a través de Stratech UK.

Las condiciones de CL/EM fueron las siguientes:

La espectrometría de masas por electropulverización de modo positivo se realizó usando un Waters Aquity H-class. Las fases móviles utilizadas fueron disolvente A (agua con ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B (acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %).

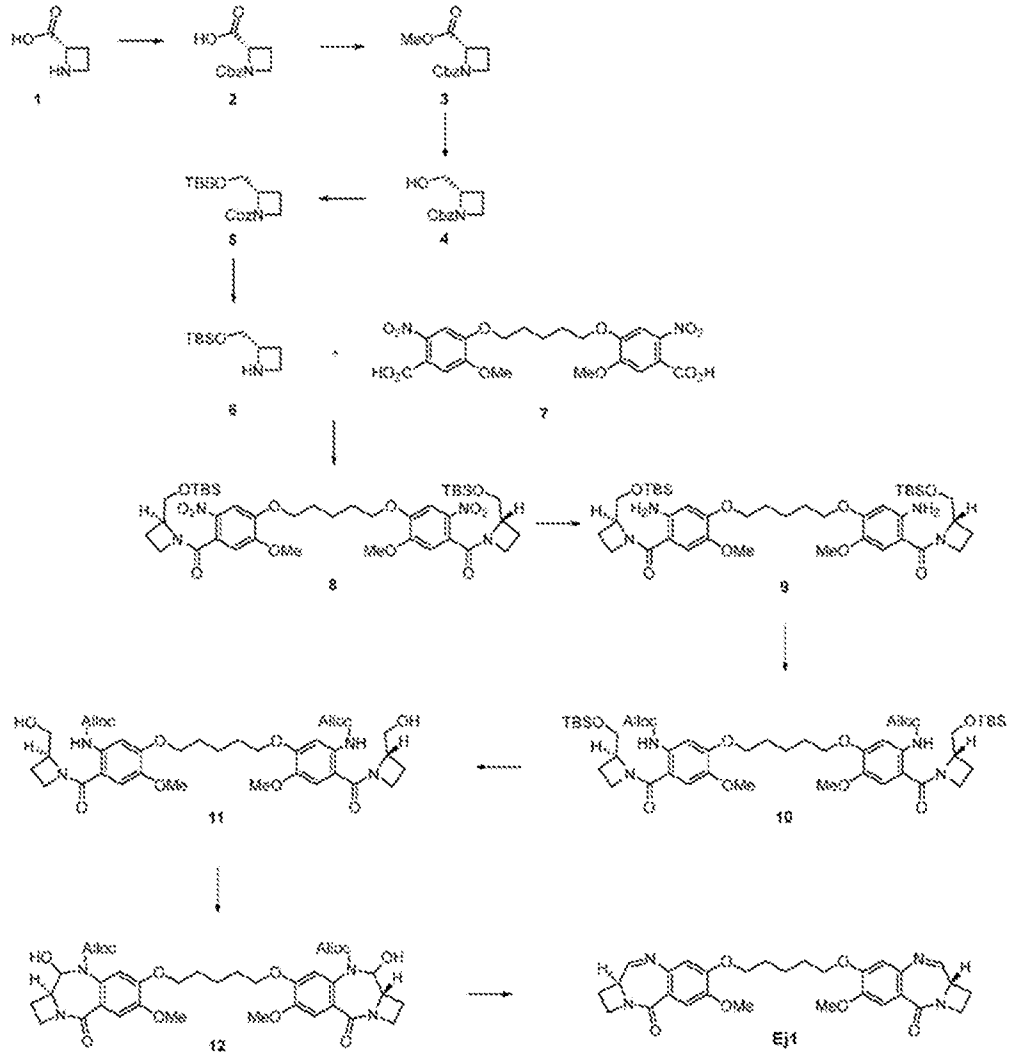
CLEM 3 min: la composición inicial fue 5 % de B mantenida durante 0,25 min, a continuación aumento del 5 % de B al 100 % de B durante un período de 2 min. La composición se mantuvo durante 0,50 min al 100 % de B, a continuación se volvió al 5 % de B en 0,05 minutos y se mantuvo allí durante 0,05 min. El tiempo total de pasada del gradiente es de 3 min. Caudal 0,8 ml/min. La detección se realizó a 254 nm. Columnas: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 µm 2,1 × 50 mm a 50 °C equipada con precolumna Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 µm, 2,1 mm × 5 mm.

CLEM 15 min: composición inicial 5 % de B mantenida durante 1 min, a continuación aumento del 5 % de B al 100 % de B durante un período de 9 min. La composición se mantuvo durante 2 min al 100 % de B, a continuación se volvió al 5 % de B en 0,10 minutos y se mantuvo allí durante 3 min. El tiempo total de pasada del gradiente es de 15 min. Caudal 0,6 ml/min. Intervalo de detección de longitud de onda: 190 a 800 nm. Temperatura del horno: 50 °C. Columna: ACE Excel 2 C18-AR, 2 µ, 3,0 × 100mm.

HPLC preparativa:

Se realizó una cromatografía líquida de alto rendimiento ultrarrápida (UFLC) de fase inversa en un aparato Shimazdzu Prominence® usando una columna Phenomenex® Gemini NX 5µ C18 (a 50 °C) de dimensiones: 150 × 21,2 mm. Los eluyentes utilizados fueron disolvente A (H_2O con ácido fórmico al 0,1 %) y disolvente B (CH_3CN con ácido fórmico al 0,1 %). Todos los experimentos de UFLC se realizaron con las condiciones de gradiente: La composición inicial de 13 % de B aumentó a 60 % de B durante un período de 15 minutos y a continuación aumentó a 100 % de B durante 2 minutos. La composición se mantuvo durante 1 minuto al 100 % de B, a continuación se volvió al 13 % de B en 0,1 minutos y se mantuvo así durante 1,9 minutos. La duración total de la pasada del gradiente fue de 20,0 minutos. El caudal fue de 20,0 ml/minuto y la detección se realizó a 254 y 280 nm.

Ejemplo 1



a) Ácido 1-((benciloxi)carbonil)azetidin-2-carboxílico (**2**)

ácido (2S)-azetidin-2-carboxílico **1** (3 g, 29,674 mmol) y bicarbonato de sodio (6,3 g, 75 mmol) se solubilizaron en H_2O (25 ml, 1387,75 mmol) y se añadió gota a gota *N*-(benciloxicarbonil)succinimida (8,5 g, 34 mmol) en THF (25 ml, 307 mmol, 100 % en masa). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 h, se dejó que las fases se separaran. La fase acuosa se lavó con éter dietílico (50 ml), se enfrió en un baño de hielo y después se acidificó hasta pH=2 con HCl conc. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml) y los extractos orgánicos combinados se secaron ($MgSO_4$) y el exceso de disolvente se evaporó al vacío para dar el producto bruto en forma de un aceite transparente. El material en bruto se usó sin purificación en la siguiente etapa. CLEM 3 min: ES^+ = 1,34 min, *m/z* 258,2 $[M + Na]^+$.

b) (S)-azetidin-1,2-dicarboxilato de 1-bencil 2-metilo (3)

En un matraz de fondo redondo seco, se solubilizó ácido (2S)-1-benciloxicarbonilazetidin-2-carboxílico **2** (6,98 g, 29,7 mmol) en MeOH (65 ml) y se añadió ácido sulfúrico (3 ml). La mezcla se calentó a reflujo y se dejó agitar durante la noche. La mezcla se dejó enfriar hasta t.a. y se inactivó con Nets (hasta pH = 7) antes de agitarse durante 1 h. Se eliminó el metanol a vacío. El residuo se recogió en EtOAc, se lavó con H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$ y se filtró. Los compuestos orgánicos se eliminaron al vacío para dar el producto bruto **3** (8,004 g, 32,11 mmol) como un aceite transparente. CLEM 3 min: ES^+ = 1,53 min, *m/z* sin ionización

c) (S)-2-(hidroximetil)azetidin-1-carboxilato de bencilo (4)

(2S)-azetidin-1,2-dicarboxilato de *O*1-bencilo *O*2-metilo **3** (7,6 g, 30 mmol) se solubilizó en THF (75 ml, 922 mmol), se enfrió a 0 °C y se añadió $LiBH_4$ (1 g, 45 mmol). La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante una hora más, momento en el que se completa la reacción. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C antes de detenerse con H_2O y HCl 1 M. Los compuestos volátiles se eliminaron al vacío. El residuo se recogió en EtOAc y se lavó con salmuera (2 x 50 ml), se secó con $MgSO_4$, se filtró y el disolvente se eliminó mediante evaporación rotatoria

a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 100 % a 1:2) dio el producto **4** como un aceite transparente (4,076 g, rendimiento del 60 % en 3 etapas). CLEM 3 min: ES^+ = 1,36 min, *m/z* 222,3 $[M + H]^+$.

d) (*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carboxilato de bencilo (**5**)

(2*S*)-2-(hidroximetil)azetidin-1-carboxilato de bencilo **4** (4,0766 g, 18,425 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 seco (20 ml, 312,0 mmol) y la mezcla se enfrió a 0 °C antes de añadir imidazol (2,508 g, 36,84 mmol) y TBS-Cl (4,16 g, 27,6 mmol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se dejó en agitación. La CLEM muestra que la reacción se completó en 5 min. Los componentes orgánicos se lavaron con NH_4Cl sat., agua, salmuera, se secaron con $MgSO_4$, se filtraron y los volátiles se eliminaron al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 100 % a 9:1) dio el producto **5** (6,90 g, no completamente seco, cuantitativo). CLEM 3 min: ES^+ = 2,15 min, *m/z* 336,9 $[M + H]^+$.

e) (*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidina (**6**)

Se trató paladio sobre carbón (10 %) (100 mg, 0,93 mmol) con EtOAc (5 ml) gota a gota y la suspensión resultante se añadió a una suspensión de **5** (6,9027 g, 20,57 mmol) en EtOH (100 ml) a temperatura ambiente en una botella de hidrogenación de Parr. La mezcla de reacción se sometió a gas H_2 a 137895 Pa (20 psi) y, a continuación, se evacuó la botella al vacío (se repitió 3 veces). A continuación, se llenó la botella hasta 262001 Pa (38 psi) de H_2 y se agitó durante 1 hora. La presión cayó a -206843 Pa (~30 psi) durante este tiempo y la botella se rellenó nuevamente a 275790 Pa (40 psi) y se agitó durante una hora más. No se observaron más disminuciones de presión y la reacción se consideró completa. Esto fue confirmado por CL-EM. La mezcla se filtró a través de celite y el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar el producto **6** bruto como un aceite marrón (3,761 g, 90 % de rendimiento). CLEM 3 min: ES^+ = 1,70 min, *m/z* sin ionización.

f) ((*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-il)(4-(6-(4-((2*R*)-2-(((*terc*butildimetilsilil)oxi)metil)ciclobutano-1-carbonil)-2-metoxi-5-nitrofenoxi)hexil)-5-metoxi-2-nitrofenil)metanona (**8**)

Se añadió DCC (3,8 g, 18 mmol) a una solución de **7** (3,9 g, 7,9 mmol) y HOBt (2,3 g, 17 mmol) en CH_2Cl_2 (200 ml) a 0 °C. Se retiró el baño frío y se dejó que la reacción prosiguiera durante 30 min a temperatura ambiente, momento en el cual se añadió rápidamente una solución de **6** (3,65 g, 18 mmol) y trietilamina (3,2 ml, 23 mmol) en CH_2Cl_2 (200 ml) a -10 °C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente y se controló por CL/EM. Después de 2 min, la reacción se completó. Los sólidos se eliminaron mediante filtración sobre celite y la fase orgánica se lavó con HCl acuoso 0,1 M frío hasta que se midió un pH de 2. La fase orgánica se lavó a continuación con agua, seguido de bicarbonato de sodio acuoso saturado, salmuera, se secó con $MgSO_4$, se filtró y se succionó a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc/CH_2Cl_2, 100 % a 1:2:1) dio el producto **8** (5,9 g, rendimiento del 87 %). El producto está contaminado con algún producto monoacoplado (la impureza no se separa mediante cromatografía). CLEM 3 min: ES^+ = 2,35 min, *m/z* 862,2 $[M+H]^+$.

g) ((Pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenilen))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-il)metanona) (**9**)

Se añadió lentamente zinc (4,65 g, 71,1 mmol) a una solución de **8** (2,45 g, 2,85 mmol) en una mezcla de MeOH/H_2O/ácido fórmico 90:5:5 (66 ml). La exotermia resultante se controló usando un baño de hielo para mantener la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 40 °C. Al finalizar, los sólidos se eliminaron mediante filtración sobre celite y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El material bruto **9** (2,28 g, cuantitativo) se usó tal cual en la siguiente etapa. CLEM 3 min: ES^+ = 2,32 min, *m/z* 802,3 $[M+H]^+$.

h) ((Pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(6-((S)-2-(((*terc*butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxi-3,1-fenilen))dicarbamato de dialilo (**10**)

El compuesto **9** (2,23 g, 2,78 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (50 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a -78 °C antes de añadir piridina (0,99 ml, 12,3 mmol) y cloroformiato de alilo (0,738 ml, 2,49 mmol). La reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 10 min antes de dejar que se calentara a temperatura ambiente. Después de 15 min se completó la reacción. Los componentes orgánicos se lavaron con $CuSO_4$ sat., H_2O, salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtraron y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El producto bruto **10** (1,47 g, 1,52 mmol, cuantitativo) se usó tal cual en la etapa siguiente. CLEM 3 min: ES^+ = 2,53 min, *m/z* 970,3 $[M+H]^+$.

i) ((Pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(6-((S)-2-(hidroximetil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxi-3,1-fenilen))dicarbamato de dialilo (**11**)

El compuesto **10** (1,47 g, 1,52 mmol) se solubilizó en una mezcla 3:1:1 de H_2O/THF/ácido acético (16 ml) y la reacción se dejó en agitación durante el fin de semana. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación

mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 100 % a 1:1) dio el producto **11** (859 mg, rendimiento del 76,5 %) como un aceite transparente. CLEM 3 min: ES^+ = 1,75 min, *m/z* 742,0 $[M+H]^+$.

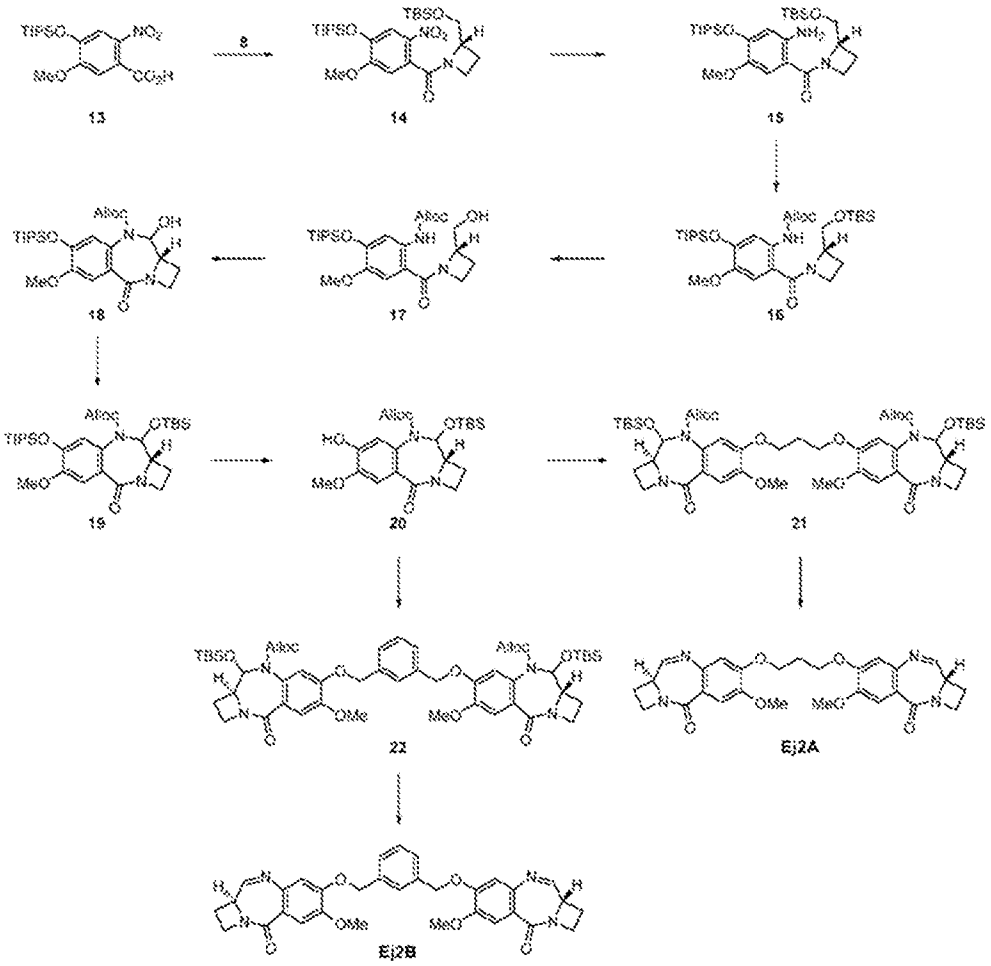
j) 7,7'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))(10a*S*,10 a'*S*)-*bis*(10-hidroxi-6-metoxi-4-oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato) de dialilo (**12**)

El compuesto **11** (850 mg, 1,14 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (60 ml). Posteriormente se añadieron 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina; 1-metilimidazol; 2-(2-piridil)piridina (0,7 ml, 1140 mmol, 0,2 mMl/l) y triflato de tetrakisacetonitrilo de cobre(I) (55 mg, 0,145 mmol) y la mezcla se agitó a 35 °C con 2 globos de aire haciendo presión. La reacción se dejó agitar durante la noche antes de aspirarla hasta sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 95:5) dio el producto **12** (346 g, 0,47 mmol, rendimiento del 41 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,48 min, *m/z* 737,9 $[M+H]^+$.

k) (10a*S*,10a'*S*)-7,7'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(6-metoxi-1,10a-dihidroazeto[1,2-*a*]benzo[*e*][1,4]diazepin-4(2*H*)-ona) (**Ej1**)

El compuesto **12** (335 mg, 0,45 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (20 ml) en un matraz con argón. Posteriormente se añadieron pirrolidina (650 µl, 7,8 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (50 mg, 0,004 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se completó. Los componentes orgánicos se lavaron con NH_4Cl sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en Isolera (CH_2Cl_2/(CH_2Cl_2+10 % de MeOH) 92:7 a 10:90. Se aislaron dos fracciones que contenían el producto pero con pureza insuficiente. Las fracciones se combinaron y se repurificaron mediante cromatografía manual y se aisló el producto puro **Ej1** (146 mg, 0,27 mmol, rendimiento del 24 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,32 min, *m/z* 533,8 $[M+H]^+$. CLEM 15 min: ES^+ = 4,83 min, *m/z* 533,9 $[M+H]^+$.

Ejemplo 2



a) ((*S*)-(2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)fenil)metanona (**13**)

Se añadió DCC (4,021 g, 19,49 mmol) a una solución de ácido 5-metoxi-2-nitro-4-triisopropilsililoxi-benzoico. **13** (6 g, 16,24 mmol) y HOPO (1,984 g, 17,86 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) a 0 °C. Se retiró el baño frío y se dejó que la reacción prosiguiera durante 30 minutos a temperatura ambiente, momento en el cual se añadió rápidamente una solución de [(2*S*)-azetidin-2-il]metoxi-*terc*-butil-dimetil-silano **6** (3,761 g, 18,68 mmol) y trietilamina (3,39 ml, 33,5 mmol) en CH_2Cl_2 (100 ml) a -10 °C en una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente y se controló por CL/EM. Después de 2 min, la reacción se completó. Los sólidos se eliminaron mediante filtración sobre celite y la fase orgánica se lavó con HCl acuoso 0,1 M frío hasta que se midió un pH de 2. La fase orgánica se lavó a continuación con agua, seguido de bicarbonato de sodio acuoso saturado, salmuera, se secó con $MgSO_4$, se filtró y se succionó a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 100 % a 1:1) dio el producto **14** (8,6737 g, rendimiento del 96,63 %). CLEM 3 min: ES^+ = 2,44 min, *m/z* 554,2 $[M+H]^+$.

b) (S)-(2-amino-5-metoxi-4-((triisopropilsilil)oxi)fenil)(2-((((*terc*butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-il)metanona (**15**)

Se añadió lentamente zinc (10 g, 152,9 mmol) a una solución de **14** (8,6737 g, 15,69 mmol) en una mezcla de MeOH/H_2O/ácido fórmico 90:5:5 (200 ml). La exotermia resultante se controló usando un baño de hielo para mantener la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 40 °C. Al finalizar, los sólidos se eliminaron mediante filtración sobre celite y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El material bruto **15** (7,6343 g, 14,6 mmol, rendimiento del 93,05 %) se usó tal cual en la siguiente etapa. CLEM 3 min: ES^+ = 2,42 min, *m/z* 524,4 $[M+H]^+$.

c) (*S*)-(2-(2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triisopropilsilil)oxi)fenil)carbamato de alilo (**16**)

El compuesto **15** (7,6343 g, 14,60 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (100 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a -78 °C antes de añadir piridina (2,6 ml, 32 mmol) y cloroformiato de alilo (1,7 ml, 16 mmol). La reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 10 minutos antes de dejarla calentar hasta temperatura ambiente. Después de 15 min se completó la reacción. Los componentes orgánicos se lavaron con $CuSO_4$ sat., H_2O, salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtraron y los volátiles se eliminaron a presión reducida. El producto bruto **16** (8,9129 g, 14,69 mmol, cuantitativo) se usó tal cual en la siguiente etapa. CLEM 3 min: ES^+ = 2,53 min, *m/z* 608,2 $[M+H]^+$.

d) (*S*)-(2-(2-(hidroximetil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triisopropilsilil)oxi)fenil)carbamato de alilo (**17**)

El compuesto **16** (8,9129 g, 14,69 mmol) se solubilizó en una mezcla 3:1:1 de H_2O/THF/ácido acético (80 ml) y la reacción se dejó en agitación durante el fin de semana. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (Hex/EtOAc, 100 % a 1:1) dio el producto **17** (5,5572 g, rendimiento del 76,80 %) como un aceite transparente. CLEM 3 min: ES^+ = 1,97 min, *m/z* 494,0 $[M+H]^+$.

e) (10a*S*)-10-hidroxi-6-metoxi-4-oxo-7-((triisopropilsilil)oxi)-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato de alilo (**18**).

El compuesto **17** (5,5572 g, 11,28 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (40 ml). Posteriormente se añadieron 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina; 1-metilimidazol; posteriormente se añadieron 2-(2-piridil)piridina (6 ml, 1 mmol) y triflato de tetrakisacetonitrilo de cobre(I) (425 mg, 1,1279 mmol) y la mezcla se agitó a 35 °C con 2 globos de aire haciendo presión. Se dejó agitar durante la noche antes de aspirarlo hasta sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 97:3) dio el producto **18** (5,3835 g, 10,97 mmol, rendimiento del 97,27 %) como una espuma de color naranja claro. CLEM 3 min: ES^+ = 2,00 min, *m/z* 491,8 $[M+H]^+$.

f) (10aS)-10-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-6-metoxi-4-oxo-7-((tri*iso*propilsilil)oxi)-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato de alilo (**19**)

El compuesto **18** (5,3835 g, 10,97 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (50 ml) y la mezcla se enfrió a -78 °C. Posteriormente se añadieron 2,6-lutidina (2,55 ml, 21,9 mmol) y TBS-OTf (3,78 ml, 16,4 mmol). La mezcla se dejó durante 10 minutos antes de retirar el baño de enfriamiento y dejar que se calentara hasta temperatura ambiente. Los componentes orgánicos se lavaron con, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 95:5) dio el producto **19** (6,8532 g, cuantitativo). CLEM 3 min: ES^+ = 2,47 min, *m/z* 606,0 $[M+H]^+$.

g) (10aS)-10-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-7-hidroxi-6-metoxi-4-oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato de alilo (**20**)

El compuesto **19** (6,8 g, 14 mmol) se solubilizó en DMF (10 ml). Se añadió $LiOAc.2H_2O$ (1,4 g, 14 mmMl) y H_2O (3 ml o tanto como fuera posible). Cuando la solución vuelve a ser transparente, se añaden unas gotas de agua. Se sigue repitiendo el proceso hasta que se complete la reacción. Los componentes orgánicos se diluyeron con $CHCl_3$ y se lavaron con una solución de ácido cítrico (pH=3), H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 %

a 95:5) dio el producto **20** (5,2885 g, 11,79 mmol, rendimiento del 85 %) como un aceite amarillo. CLEM 3 min: ES^+ = 1,86 min, *m/z* 449,8 $[M+H]^+$.

h) 7,7'-(propano-1,3-diilbis(oxi))(10aS,10a'*S*)-bis(10-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)-6-metoxi-4-oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato) de dialilo (**21**)

1,3-dibromopropano (204,9 mg, 1,015 mmol) y el compuesto **20** (1 g, 2,030 mmol) se solubilizaron en CH_2Cl_2 (50 ml) en una atmósfera de argón. Posteriormente se añadieron K_2CO_3 (280 mg, 2,026 mmol) y TBAI (149 mg, 0,2 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a 40 °C hasta que se completó. La mezcla se dejó en agitación durante la noche pero la reacción no se completó, sino que se formó una impureza. Los componentes orgánicos se lavaron con H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 97:3) dio el producto **21** (482 mg, 0,471 mmol, rendimiento del 46,50 %), contaminado con una impureza inseparable (t.a. = 9,95 min en CLEM 15 min). CLEM 15 min: ES^+ = 9,86 min, *m/z* 938,3 $[M+H]^+$.

i) (10a*S*,10a'*S*)-7,7'-(propan-1,3-diilbis(oxi))bis(6-metoxi-1,10a-dihidroazeto[1,2-*a*]benzo[e][1,4]diazepin-4(2*h*)-ona) (**Ej2A**)

El compuesto **21** (482 mg, 0,5143 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (20 ml) en un matraz en atmósfera de argón. Posteriormente se añadieron pirrolidina (786 µl, 9,44 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (54 mg, 0,046 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se completó. Los componentes orgánicos se lavaron con NH_4Cl sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. Purificación por cromatografía en Isolera (CH_2Cl_2/(CH_2Cl_2 + 10 % de MeOH) 98:2 a 30:70. Se aislaron dos fracciones que contenían el producto pero con pureza insuficiente. Las fracciones se combinaron y se repurificaron mediante cromatografía en Isolera (mismo sistema de disolventes) y el producto puro **Ej2A** se aisló (35,1 mg, 0,135 mmol, rendimiento del 13,5 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,23 min, *m/z* 505,8 $[M+H]^+$.

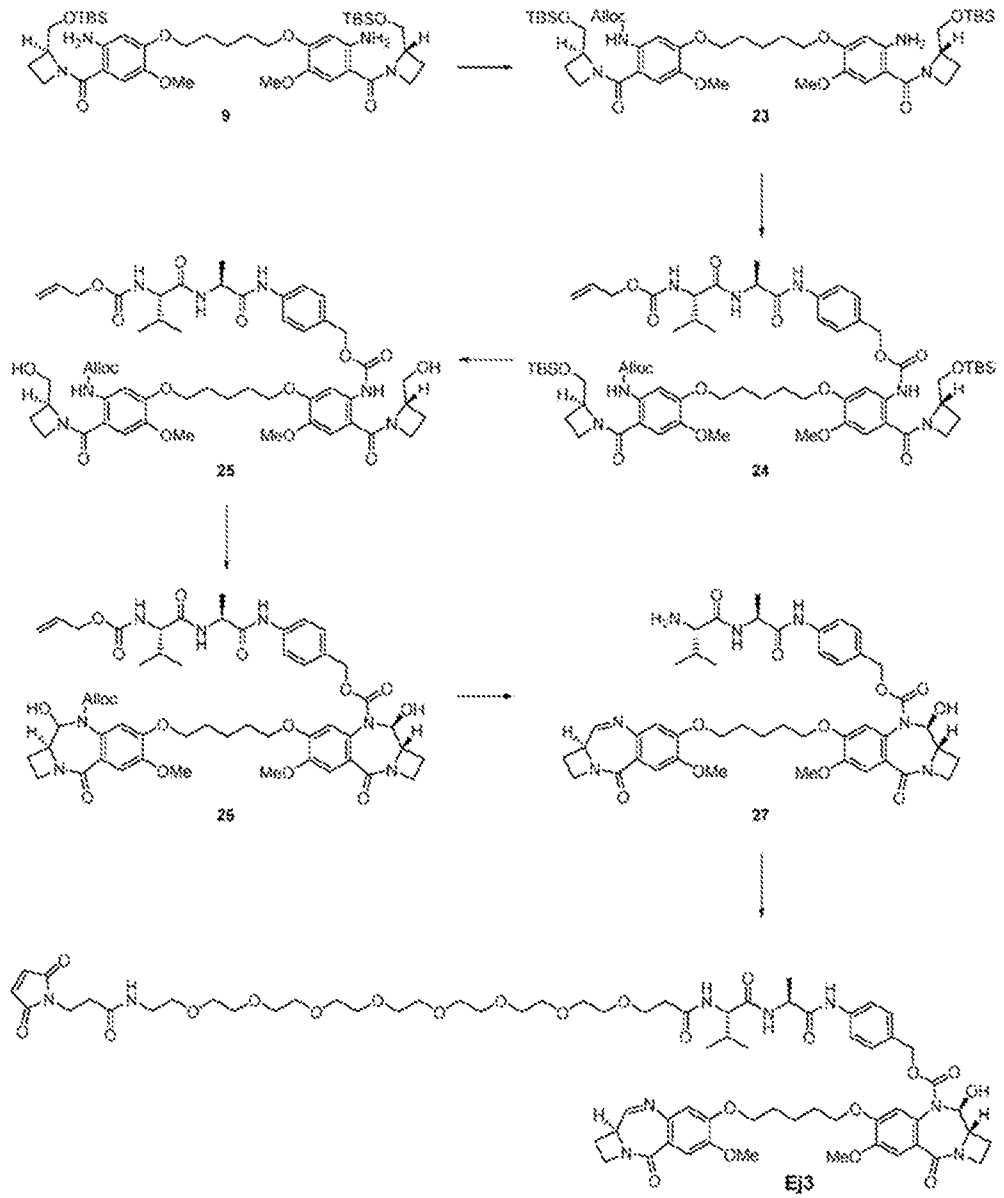
j) 7,7'-((1,3-fenilenbis(metilen))bis(oxi))(10aS,10a'*S*)-bis(10-((*terc*butildimetilsilil)oxi)-6-metoxi-4-oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato) de alilo (**22**)

1,3-Bis(bromometil)benceno (267,9 mg, 1,011 mmol) y el compuesto **20** (1 g, 2,030 mmol) se solubilizaron en DMF (5 ml) en atmósfera de argón. Posteriormente se añadieron K_2CO_3 (280 mg, 2,026 mmol) y TBAI (749 mg, 2,027 mmol) y la mezcla se dejó agitar a 40 °C hasta que se completó. La mezcla se dejó agitar durante la noche pero la reacción no llegó a completarse y se formó una impureza. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 97:3) dio el producto **22** (467 mg, 0,43 mmol, rendimiento del 42,47 %) + 398 mg de fracciones mixtas. CLEM 3 min: ES^+ = 2,30 min, *m/z* 1000,5 $[M+H]^+$.

k) (10a*S*,10a'*S*)-7,7'-((1,3-fenilenbis(metilen))bis(oxi))bis(6-metoxi-1,10a-dihidroazeto[1,2-*a*]benzo[*e*][1,4]diazepin-4(2*H*)-ona) (**Ej2B**)

El compuesto **22** (455 mg, 0,419 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (20 ml) en un matraz en atmósfera de argón. Posteriormente se añadieron pirrolidina (600 µl, 7,2 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (48 mg, 0,041 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se completó. Los componentes orgánicos se lavaron con NH_4Cl sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. Purificación por cromatografía en Isolera (CH_2Cl_2/(CH_2Cl_2 + 10 % de MeOH) 98:2 a 30:70. Se aislaron dos fracciones que contenían el producto pero con pureza insuficiente. Las fracciones se combinaron y se repurificaron mediante cromatografía en Isolera (mismo sistema de disolventes) y el producto puro **Ej2B** se aisló (214,5 mg, 0,378 mmol, rendimiento del 90,5 %) como un sólido blanco. CLEM 3 min: ES^+ = 1,38 min, *m/z* 567,8 $[M+H]^+$.

Ejemplo 3



a) (5-((5-(5-amino-4-((*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de alilo (**23**)

El compuesto **9** (1,192 g, 1,488 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (250 ml) en atmósfera de argón. La mezcla se enfrió a -78 °C antes de añadir piridina (0,241 ml, 2,98 mmol) y cloroformiato de alilo (0,158 ml, 1,484 mmol). La reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 10 min antes de dejar que se calentara a temperatura ambiente. Después de 15 min se completó la reacción. Los componentes orgánicos se lavaron con $CuSO_4$ sat., H_2O, salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtraron y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH) produjo una mezcla de mono y bis-alloc que se purificó adicionalmente con una segunda columna (Hex/EtOAc) para dar el producto puro **23** (499,2 g, 37,9 % de rendimiento del 50 % posible). CLEM 3 min: ES^+ = 2,41 min, *m/z* 886,6 $[M+H]^+$.

b) (5-((5-(5-((((4-((S)-2-((*S*)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((*S*)-2-(((*terc*butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((*S*)-2-(((*terc*-butildimetilsilil)oxi)metil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de alilo (**24**)

Se añadió trifosgeno (68,8 mg, 0,232 mmol) en una porción a una mezcla de **23** (620 mg, 0,7 mmol) y TEA (203 µl, 1,46 mmol) en CH_2Cl_2 (50 ml) a 0 °C. Se retiró el baño de hielo y después de 15 min, se añadió Alloc-Val-Ala-PAB-OH (275 mg, 0,728 mmol) en una porción como un polvo fino, seguido de más TEA (73 µl, 0,524 mmol) y dilaurato de dibutilestaño (39,6 µl, 0,07 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a 37 °C durante 4 h, seguido de agitación

a temperatura ambiente durante la noche. Los extractos orgánicos se lavaron con H_2O, NH_4Cl sat. y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. Purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH) para dar el producto puro **24** (414 g, rendimiento del 45,9 %). CLEM 3 min: ES^+ = 2,43 min, *m/z* 1289,5 $[M+H]^+$.

c) (5-((5-(5-((((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((*S*)-2-(hidroximetil)azetidin-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((*S*)-2-(hidroximetil)azetidin-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de alilo (**25**)

El compuesto **24** (414 mg, 0,32 mmol) se solubilizó en una mezcla 3:1:1 de H_2O/THF/ácido acético (10 ml) y la reacción se dejó en agitación durante el fin de semana. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con $NaHCO_3$ sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 94:6) dio el producto **25** (326 mg, rendimiento del 95,7 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,80 min, *m/z* 1060,1 $[M+H]^+$.

d) (10a*S*)-7-((5-(((10*S*,10a*S*)-9-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)-10-hidroxi-6-metoxi-4-oxo-1,2,4,9,10,10a-hexahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-7-il)oxi)pentil)oxi)-10-hidroxi-6-metoxi-4-oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato de alilo (**26**)

El compuesto **25** (202,4 mg, 0,3 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (20 ml). Posteriormente se añadieron 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina; 1-metilimidazol; 2-(2-piridil)piridina (0,4 ml, 0,03 mmol) y triflato de tetrakisacetonitrilo de cobre (I) (11 mg, 0,03 mmol) y la mezcla se agitó a 35 °C con 2 globos de aire haciendo presión. Se dejó agitar durante la noche antes de aspirarlo hasta sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice ($CHCl_3$/MeOH, 100 % a 97:3) dio el producto **26** (313 mg, 0,19 mmol, rendimiento del 64,5 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,59 min, *m/z* 1057,1 $[M+H]^+$.

e) (10*S*,10a*S*)-10-hidroxi-6-metoxi-7-((5-(((*S*)-6-metoxi-4-oxo-1,2,4,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-7-il)oxi)pentil)oxi)-4- oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-9(4H)-carboxilato) de 4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**27**)

El compuesto **26** (195 mg, 0,184 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (10 ml) en un matraz en una atmósfera de argón. Posteriormente se añadieron pirrolidina (262 µl, 3,15 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (21 mg, 0,018 mmol) y la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta que se completó. Los componentes orgánicos se lavaron con NH_4Cl sat, H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en Isolera (CH_2Cl_2/(CH_2Cl_2+10 % de MeOH) 98:2 a 30:70 dio el producto **27** (141 mg, 0,16 mmol, rendimiento del 87,7 %). CLEM 3 min: ES^+ = 1,23 min, *m/z* 870,9 $[M+H]^+$.

f) (10*S*,10a*S*)-10-hidroxi-6-metoxi-7-((5-(((*S*)-6-metoxi-4-oxo-1,2,4,10a-tetrahidroazeto[1,2-a]benzo[e][1,4]diazepin-7-il)oxi)pentil)oxi)-4- oxo-1,2,10,10a-tetrahidroazeto[1,2-*a*]benzo[*e*][1,4]diazepin-9(4*h*)-carboxilato de 4-((2*S*,5*S*)-37-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencilo (**Ej3**)

La reacción se llevó a cabo en una caja de guantes. El compuesto **27** (70 mg, 0,080 mmol) se solubilizó en CH_2Cl_2 (10 ml) en un matraz en una atmósfera de argón a temperatura ambiente. Se añadieron Mal-dPEGs-OH (50 mg, 0,084 mmol) y EDCI.HCl (15,4 mg, 0,080 mmol) y la mezcla se agitó hasta su finalización. Los componentes orgánicos se lavaron con H_2O y salmuera antes de secarse con $MgSO_4$, se filtró y los volátiles se eliminaron a presión reducida. La purificación por cromatografía en Isolera (CH_2Cl_2/(CH_2Cl_2+10 % de MeOH) 98:2 a 30:70 dio un producto impuro. La purificación adicional mediante Isolera de fase inversa dio como resultado el **Ej3** puro (4 mg, 0,027 mmol, rendimiento del 3,4 %) más algunas fracciones sucias (22 mg). CLEM 3 min: ES^+ = 1,51 min, *m/z* 1445,6 $[M+H]^+$.

Ejemplo 4

ConjA (Her2-Ex3)

Se añadió una solución 10 mM de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS) (50 equivalentes molares/anticuerpo, 7,6 micromoles, 762,7 µl) a una solución de 20,8 ml de trastuzumab (22,9 mg, 153 nanomoles) en tampón de reducción que contiene histidina 30 mM/histidina HCl, arginina 30 mM, pH 6,8 y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,1 mg/ml. La mezcla reductora se dejó reaccionar a 37 °C durante 2 horas (o hasta que se observe una reducción completa mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). La solución de anticuerpo reducido se intercambió con tampón (para eliminar todo el exceso de agente reductor), mediante centrifugación del filtro giratorio, en un tampón de conjugación que contiene histidina 30 mM/histidina HCl, arginina 30 mM y EDTA 1 mM para una concentración final de anticuerpo de 1,1 mg/ml. El **Ej3** se añadió como una solución de DMSO (12,5 equivalentes molares/anticuerpo, 1,9 micromoles, en 2,1 ml de DMSO) a 18,6 ml de esta solución de anticuerpo reducido (20,5 mg, 136 nanomoles) para una concentración final de DMSO al 10 % (*v/v*). La solución se mezcló durante 17 horas a temperatura ambiente, a

continuación la conjugación se detuvo mediante la adición de N-acetilcisteína (8,5 micromoles, 68 µl a 100 mM), a continuación se purificó mediante centrifugación con filtro giratorio usando un filtro giratorio Amicon Ultracell 30KDa MWCO de 15 ml, se esterilizó por filtración y se analizó.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence utilizando una columna Thermo Scientific AcMoPac de 50 mm x 2,1 mm eluyendo con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del ConjA a 214 nm y 330 nm (específico de SG3931) muestra una mezcla de cadenas ligeras no conjugadas, cadenas ligeras unidas a una sola molécula de SG3931, cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas unidas a hasta tres moléculas de SG3931, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR) de 7,32 moléculas de SG3931 por anticuerpo.

El análisis por UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence utilizando una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP de 4 µm 4,6 x 150 mm (con una precolumna de 4 µm 3,0 x 20 mm) eluyendo con 0,3 ml/minuto de tampón de SEC esterilizado por filtración que contenía de fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (*v/v*) en una muestra del ConjA a 280 nm muestra una pureza de monómero del 94,2 %. El análisis de UHPLC SEC proporciona una concentración de ConjA final de 1,29 mg/ml en 5,8 ml, la masa obtenida de ConjA es de 7,5 mg (37 % de rendimiento).

Ejemplo 5 - Ensayo de citotoxicidad

La potencia de las moléculas se midió mediante ensayos *in vitro* de citotoxicidad en la línea celular de carcinoma NCI-N87.

El material sólido se disolvió en DMSO hasta obtener una solución madre 2 mM, de la cual se realizaron ocho diluciones seriadas en una proporción 1:10 en DMSO y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Las células NCI-N87 adherentes se lavaron con D-PBS y se separaron con tripsina-EDTA, a continuación se determinaron la densidad celular y la viabilidad por duplicado mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano utilizando un contador celular automatizado (LUNA-II™). La suspensión celular se diluyó a 1 x 10^5 células/ml en medio de crecimiento (RPMI 1640 con Glutamax + suero bovino fetal HyClone™ al 10 % (v/v) y se agitó antes de dispensar 2 ml por pocillo en placas de polipropileno estériles de 3 ml. A continuación, se dispensaron diluciones de inhibidores covalentes ("warhead") en los pocillos apropiados a razón de 10 µl/pocillo y se mezclaron mediante pipeteo repetido. Para los pocillos de control, se dispensaron 10 µl de DMSO en 2 ml de suspensión celular y se mezclaron completamente. A continuación, se dividieron alícuotas de 100 µl de cada muestra en 2 pocillos replicados de una microplaca plana estéril de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora con gas CO_2 a 37 °C (5 %). Al final del período de incubación (7 días), la viabilidad celular se midió mediante el ensayo CellTiter 96 Aqueous One (MTS), que se dispensó a 20 µl/pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C, CO_2 al 5 %. A continuación, se leyeron las placas en un EnVision Multi-label Plate Reader (Perkin Elmer) usando absorbancia a 490 nm.

El porcentaje de supervivencia celular se calculó a partir de la absorbancia media de los 2 pocillos replicados para cada muestra, en comparación con la absorbancia media en los dos pocillos de control tratados solo con DMSO (100 %). La CI_{50} se determinó ajustando cada conjunto de datos a curvas sigmoidales de dosis-respuesta con una pendiente variable utilizando el algoritmo de ajuste de curva no lineal en el software GraphPad Prism (San Diego, CA).

Todos los experimentos de este trabajo se llevaron a cabo y probaron en tres experimentos independientes. Los datos se presentan como la media de las tres réplicas independientes.

	CI_{50} (nM)
Ex2A	70,11
Ex1	2,202
Ex2B	4,035

Ejemplo 6 - ensayo de citotoxicidad de ADC

La concentración y la viabilidad de células de un matraz T75 subconfluente (confluencia del 80-90 %) se miden mediante tinción con azul de tripano y se cuentan utilizando el contador celular automatizado LUNA-II™. Las células se diluyeron a 2 × 10^5/ml, se dispensaron (50 µl por pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos.

Se preparó una solución madre (1 ml) del conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) (20 µg/ml) de prueba mediante dilución del ADC esterilizado por filtración en medio de cultivo celular. Se preparó un conjunto de 8x diluciones al décimo del ADC de reserva en una placa de 24 pocillos mediante la transferencia en serie de 100 µl en 900 µl de medio de cultivo celular. Se dispensó la dilución de ADC (50 µl por pocillo) en 4 pocillos repetidos de la placa de 96 pocillos, que contenían 50 µl de suspensión celular sembrada previamente. Los pocillos de control recibieron 50 µl de medio de cultivo celular. La placa de 96 pocillos que contenía células y ADC se incubó a 37 °C en una incubadora con gas CO_2 durante el tiempo de exposición.

Al final del periodo de incubación, la viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTS. Se dispensó MTS (Promega)

(20 µl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora con gas CO_2. Se midió la absorbancia de los pocillos a 490 nm. El porcentaje de supervivencia celular se calculó a partir de la absorbancia media en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la absorbancia media en los 4 pocillos de control sin tratar (100 %). La CI_{50} se determinó a partir de los datos de respuesta a la dosis utilizando GraphPad Prism utilizando el algoritmo de ajuste de curva no lineal: curva dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable.

Los tiempos de incubación con ADC fueron 4 días con MDA-MB-468 y 7 días para NCI-N87. MDA-MB-468 y NCI-N87 se cultivaron en RPMI 1640 con Glutamax + suero bovino fetal HyClone™ al 10 % (v/v).

Los valores de CE_{50} se determinaron ajustando los datos a una curva dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable utilizando el software GraphPad Prism v6.05 (GraphPad, San Diego, CA).

	CE_{50} (µg/ml)	
	NCI-N87	MDA-MB-468
ConjA	0,002285	15,71

Ejemplo 7: prueba de xenoinjerto

Ratones xenoinjertados NCI-N87

Los ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (Fox Chase SCID®, *C.B-17*/Icr-*Prkdcscid,* Charles River) tenían ocho semanas de edad con un peso corporal (BW) en el intervalo de 16,5 a 21,6 g el día 1 del estudio. Se alimentó a los animales a voluntad con agua (ósmosis inversa, 1 ppm Cl) y Lab Diet® NIH 31 modificada e irradiada que consistía en 18,0 % de proteína bruta, 5,0 % de grasa bruta y 5,0 % de fibra bruta. Se alojó a los ratones en lechos para animales de laboratorio Enrich-o'cobs™ irradiados en microaislantes estáticos en un ciclo de 12 horas de luz a 20-22 °C (68-72 °F) y humedad del 40-60 %. CR Discovery Services cumple específicamente con las recomendaciones de la *Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio* con respecto a los procedimientos de restricción, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de alimentos y líquidos, y atención veterinaria. El programa de cuidado y uso de animales en CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Cultivo de células tumorales

Se cultivaron células de linfoma de carcinoma gástrico humano NCI-N87 en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, penicilina G de sodio 100 unidades/ml, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 µg/ml de gentamicina. Las células se cultivaron en matraces de cultivo de tejidos en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera del 5 % de CO_2 y 95 % de aire.

Implante in vivo y crecimiento tumoral

Las células NCI-N87 utilizadas para la implantación se recogieron durante la fase logarítmica de crecimiento y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Matrigel™ al 50 % (BD Biosciences). El día del implante del tumor, a cada ratón de prueba se le inyectó por vía subcutánea en el flanco derecho 1×10^7 células (0,1 ml de suspensión celular), y se controló el crecimiento del tumor a medida que el tamaño promedio se acercaba al intervalo diana de 100 a 150 mm^3. Catorce días después, designado como el día 1 del estudio, los ratones se clasificaron de acuerdo con el tamaño del tumor calculado en grupos, cada uno de los cuales constaba de diez animales con volúmenes tumorales individuales que oscilaban entre 108 y 144 mm^3 y volúmenes tumorales medios de grupo de 115 mm^3.

Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral } (mm^3) = \frac{w^2 \times l}{2}$$

donde w = anchura y l = longitud, en mm, del tumor. El peso del tumor se puede estimar asumiendo que 1 mg es equivalente a 1 mm^3 de volumen tumoral.

Tratamiento

El tratamiento comenzó el día 1 en grupos de 10 ratones (n=10) con tumores subcutáneos NCI-N87 establecidos (108-144 mm^3). Se administró ConjA (4 mg/kg) por vía intravenosa una vez el día 1 (una vez al día × 1). Un grupo tratado con vehículo sirvió como grupo de control para el análisis de eficacia. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que finalizó el estudio el día 79. Cada ratón fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen final de 800 mm^3 o en el último día, lo que sucediese primero. Se calculó el tiempo hasta el criterio de valoración (TTE) para cada ratón.

Los resultados se ilustran en la Figura 1, que muestra el cambio en el crecimiento tumoral normalizado (■ - control; ◆ - ConjA).

Análisis del criterio de valoración y retraso del crecimiento tumoral (TGD)

Los tumores se midieron usando calibradores dos veces por semana, y cada animal fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen del criterio de valoración de 800 mm^3 o al final del estudio (día 79), lo que sucediese primero. Los animales que salieron del estudio por el criterio de valoración del volumen tumoral fueron documentados como sacrificados por la progresión del tumor (TP), con la fecha de la eutanasia. El tiempo hasta el criterio de valoración (TTE) para el análisis se calculó para cada ratón mediante la siguiente ecuación:

$$TTE = \frac{\log_{10}(\text{volumen del criterio de valoración}) - b}{m}$$

donde TTE se expresa en días, el volumen del criterio de valoración se expresa en mm^3, b es la intersección y m es la pendiente de la línea obtenida mediante regresión lineal de un conjunto de datos de crecimiento tumoral transformado logarítmicamente. El conjunto de datos consistió en la primera observación que excedió el volumen de criterio de valoración utilizado en el análisis y las tres observaciones consecutivas que precedieron inmediatamente a la obtención de este volumen del criterio de valoración. El TTE calculado suele ser menor que la fecha TP, el día en que el animal fue sacrificado por el tamaño del tumor. A los animales con tumores que no alcanzaron el volumen del criterio de valoración se les asignó un valor de TTE igual al último día del estudio (día 79). En los casos en los que el TTE calculado con la transformación logarítmica precedió al día anterior a alcanzar el criterio de valoración o superó el día en que se alcanzó el criterio de valoración del volumen tumoral, se realizó una interpolación lineal para aproximar el TTE. Cualquier animal clasificado como muerto por causas NTR (no relacionadas con el tratamiento) debido a un accidente (NTRa) o a una etiología desconocida (NTRu) se excluyó de los cálculos de TTE (y de todos los análisis posteriores). A los animales clasificados como muertes TR (relacionadas con el tratamiento) o NTRm (muertes no relacionadas con el tratamiento debido a metástasis) se les asignó un valor de TTE igual al día de la muerte. El resultado del tratamiento se evaluó a partir del retraso del crecimiento tumoral (TGD), que se define como el aumento en la mediana del tiempo hasta el criterio de valoración (TTE) en un grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control:

$$TGD = T - C,$$

expresado en días, o como porcentaje de la mediana del TTE del grupo de control:

$$\%TGD = \frac{T-C}{C} \times 100$$

donde:

T = mediana del TTE para un grupo de tratamiento, y
C = mediana del TTE para el grupo de control designado.

Inhibición del crecimiento tumoral

El análisis de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) evalúa la diferencia en la mediana de los volúmenes tumorales (MTV) de ratones tratados y de control. Para este estudio, el criterio de valoración para determinar la TGI fue el día 19, que fue el último día en que todos los ratones de control evaluables permanecieron en el estudio. La MTV (n), la mediana del volumen tumoral para el número de animales, n, el día del análisis de la TGI, se determinó para cada grupo. El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) se definió como la diferencia entre la MTV del grupo de control designado y la MTV del grupo tratado con el fármaco, expresado como porcentaje de la MTV del grupo de control:

$$\%\ TGI = \left(\frac{MTV_{control} - MTV_{tratado\ con\ fármaco}}{MTV_{control}}\right) \times 100 = [1 - (MTV_{tratado\ con\ fármaco}/MTV_{control})] \times 100$$

El conjunto de datos para el análisis de la TGI incluyó a todos los animales de un grupo, excepto aquellos que murieron por causas relacionadas con el tratamiento (TR) o no relacionadas con el tratamiento (NTR) antes del día del análisis de la TGI.

MTV y criterios para respuestas de regresión

La eficacia del tratamiento puede determinarse a partir de los volúmenes tumorales de los animales que permanecen en el estudio el último día. La MTV (n) se definió como la mediana del volumen tumoral en el último día del estudio en el número de animales restantes (n) cuyos tumores no habían alcanzado el volumen del criterio de valoración. La eficacia del tratamiento también puede determinarse a partir de la incidencia y magnitud de las respuestas de regresión

observadas durante el estudio. El tratamiento puede provocar una regresión parcial (PR) o una regresión completa (CR) del tumor en un animal. En una respuesta PR, el volumen tumoral fue 50 % o menos de su volumen del Día 1 durante tres mediciones consecutivas durante el transcurso del estudio, e igual o mayor que 13,5 mm^3 para una o más de estas tres mediciones. En una respuesta CR, el volumen tumoral era inferior a 13,5 mm^3 durante tres mediciones consecutivas durante el transcurso del estudio. Los animales fueron puntuados solo una vez durante el estudio para un acontecimiento de PR o CR y solo como CR si se cumplían ambos criterios de PR y CR. Un animal con una respuesta CR al finalizar un estudio se clasificó además como superviviente libre de tumor (TFS). Los animales fueron controlados para detectar respuestas de regresión.

Toxicidad

Los animales se pesaron diariamente los días 1 a 5, a continuación dos veces por semana hasta la finalización del estudio. Los ratones fueron observados con frecuencia en busca de signos evidentes de cualquier efecto secundario adverso relacionado con el tratamiento (TR) y se registraron los signos clínicos cuando se observaron. El peso corporal individual se controló según el protocolo, y cualquier animal con una pérdida de peso superior al 30 % en una medición o superior al 25 % en tres mediciones consecutivas fue sacrificado como muerte por TR. La pérdida de peso corporal media del grupo también se controló de acuerdo con el protocolo de CR Discovery Services. La toxicidad aceptable se definió como una pérdida media de peso corporal (PC) del grupo de menos del 20 % durante el estudio y no más del 10 % de muertes por TR. La dosificación se suspendió en cualquier grupo donde la pérdida de peso media excediera los límites aceptables. Si el peso corporal medio del grupo se recuperaba a niveles aceptables, entonces se modificaba la dosis a niveles más bajos y/o se reducía la frecuencia y luego se reanudaba. Las muertes se clasificaron como TR si eran atribuibles a efectos secundarios del tratamiento evidenciados por signos clínicos y/o necropsia. También se asignó una clasificación TR a las muertes por causas desconocidas durante el período de administración o dentro de los 14 días posteriores a la última dosis. Una muerte se clasificó como no relacionada con el tratamiento (NTR) si no había evidencia de que la muerte estuviera relacionada con los efectos secundarios del tratamiento. Las muertes por NTR se clasifican además de la siguiente manera: NTRa describe muertes debidas a accidentes o errores humanos; NTRm se asigna a muertes que se cree que son el resultado de la diseminación del tumor por invasión y/o metástasis según los resultados de la necropsia; NTRu describe muertes de causas desconocidas que carecen de evidencia disponible de muerte relacionada con metástasis, progresión del tumor, accidente o error humano. Cabe señalar que los efectos secundarios del tratamiento no pueden excluirse de las muertes clasificadas como NTRu.

Análisis estadísticos y gráficos

Se utilizó GraphPad Prism 8.0 para Windows para todos los análisis estadísticos y presentaciones gráficas. Los grupos de estudio que experimentaron toxicidad más allá de los límites aceptables (>20 % de pérdida media de peso corporal del grupo o más del 10 % de muertes relacionadas con el tratamiento) o que tuvieron menos de cinco observaciones evaluables, no fueron incluidos en el análisis estadístico. Se empleó la prueba de rangos logarítmicos para evaluar la importancia de la diferencia entre las experiencias de supervivencia general de dos grupos. La prueba de rangos logarítmicos analiza los TTE individuales de todos los animales de un grupo, excepto aquellos perdidos en el estudio debido a la muerte NTR. Los análisis estadísticos de las diferencias entre la mediana de los volúmenes tumorales (MTV) del día 19 de los grupos de control y tratados se realizaron utilizando la prueba *U* de Mann-Whitney. Para los análisis estadísticos, se realizaron pruebas de dos colas al nivel de significancia $P = 0,05$. Prism resume los resultados de la prueba como no significativos (ns) en $P > 0,05$, significativo (simbolizado por "*") en $0,01 < P \leq 0,05$, muy significativo ("**") en $0,001 < P \leq 0,01$, y extremadamente significativo ("***") en $P \leq 0,001$. Debido a que las pruebas de significación estadística no proporcionan una estimación de la magnitud de la diferencia entre grupos, todos los niveles de significancia se describieron como significativos o no significativos en el texto de este documento.

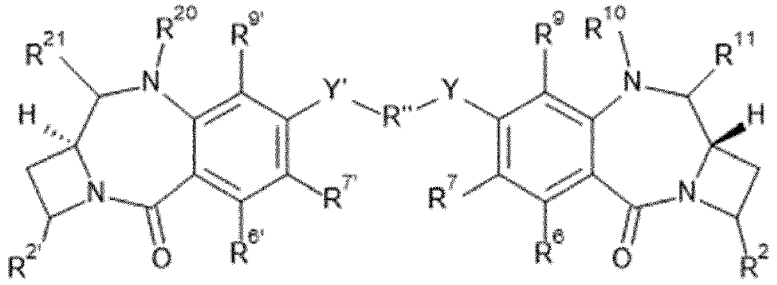
		n	Mediana TTE	T-C	%TGD	MTV (n), Día 79
Vehículo	-	10	24,8	--	-	466(10)
ConjA	4 mg/kg	10	79,0	54,2	219	32 (9)

	PR	CR	TFS	Nadir de BW	TR	NTRm	NTR
Vehículo	0	0	0	-2,0 (2)	0	0	0
ConjA	6	4	0	-1,9 (2)	0	0	0

La MTV(10) del día 19 para los animales tratados con ConjA fue de 32 mm^3, o un TGI significativo 93 % ($P < 0,001$, Mann-Whitney). Nueve animales sobrevivieron al estudio y la mediana de TTE asignada fue de 79,0 días; esto representa lo máximo posible, TGD significativo 219% ($P < 0,001$, rangos logarítmicos). La MTV(9) del día 79 fue de 320 mm^3 y hubo seis PR y cuatro CR.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula IV:



IV

y sales y solvatos del mismo, en donde:

R^2 y $R^{2'}$ son H;
R^6 y R^9 se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo; donde R y R' se seleccionan independientemente de alquilo C_{1-12} opcionalmente sustituido, heterociclilo C_{3-20} y sistemas de anillos aromáticos que comprenden 5-20 átomos en el anillo;
o bien

a) R^7 se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo; $R^{7'}$ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2, NHR, NRR', nitro, Me_3Sn y halo; o
(b) R^7 y $R^{7'}$ juntos forman un grupo que es: (i) $-O-(CH_2)_n-O-$, donde n es de 7 a 16; o (ii) $-O-(CH_2CH_2O)_m-$, donde m es de 2 a 5;

R" es un grupo alquileno C_{3-12}, cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, seleccionados de O, S, NR^{N2} donde R^{N2} es H o alquilo C_{1-4} y/o por anillos aromáticos, seleccionados de benceno o piridina;
Y e Y' se seleccionan de O, S o NH;
$R^{6'}$ y $R^{9'}$ se seleccionan de los mismos grupos que R^6y R^9 respectivamente;
o bien

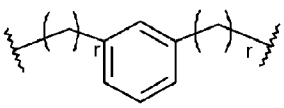
(i-a) R^{10} y R^{11} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos; o
(i-b) R^{10} es H y R^{11} se selecciona de OH y OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}; o
(i-c) R^{10} y R^{11} son ambos H;

o bien

(ii-a) R^{20} y R^{21} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos; o
(ii-b) R^{20} es H y R^{21} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}; o
(ii-c) R^{20} y R^{21} son ambos H.

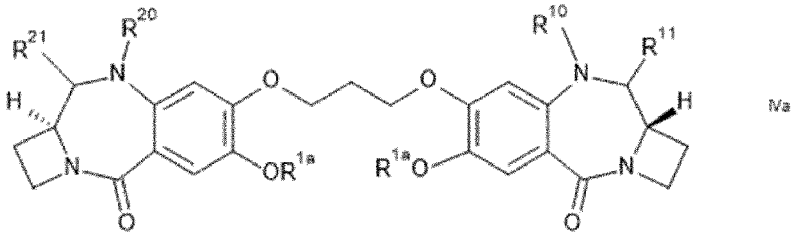
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

a) ambos Y e Y' son O; y/o
b) R" es alquileno C_{3-7}; o
c) R" es un grupo de fórmula:

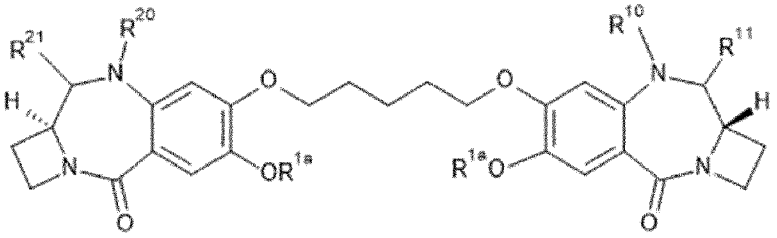


donde r es 1 o 2; y/o
d) R^9 es H, R^6 es H, R^7 y $R^{7'}$ son independientemente un grupo alquiloxi C_{1-4}; o
e) $R^{6'}$ es el mismo grupo que R^6, $R^{7'}$ es el mismo grupo que R^7, $R^{9'}$ es el mismo grupo que R^9 e Y' es el mismo grupo que Y.

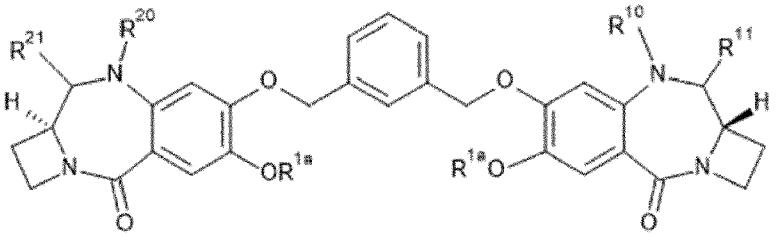
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es de las fórmulas IVa, IVb o IVc:



IVa



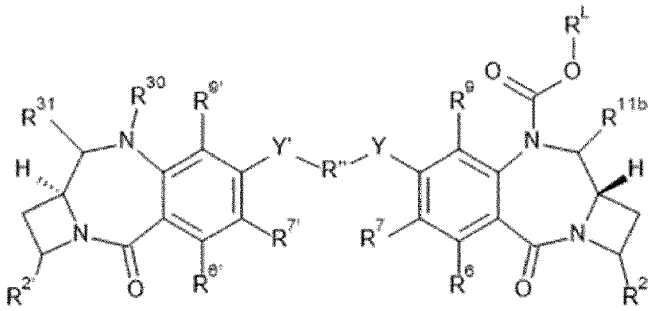
IVb



IVc

donde R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo.

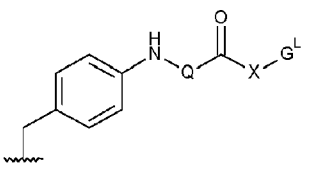
4. Un compuesto de fórmula I:



y sales y solvatos del mismo, en donde:

Y, Y', R'', R^2, $R^{2'}$, R^6, $R^{6'}$, R^7, $R^{7'}$, R^9 y $R^{9'}$ son como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
R^{11b} se selecciona de OH, OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4}; y
R^L es un enlazador para conectar con un agente de unión celular, que se selecciona de:

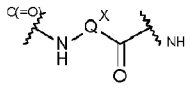
(iiia):



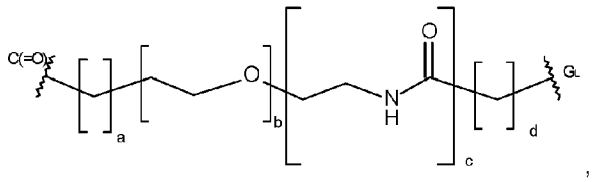
IIIa

en donde

Q es:

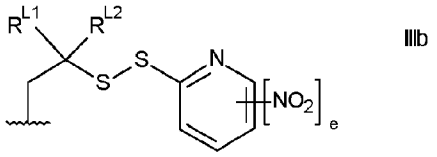


donde Q^X es tal que Q es un residuo de aminoácido, un residuo dipeptídico o un residuo tripeptídico;
X es:



donde a = de 0 a 5, b = de 0 a 16, c = 0 o 1, d = de 0 a 5;
G^L es un enlazador para conectar con un agente de unión celular; y

(iiib):

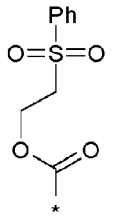


IIIb

donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1;
o:

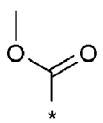
(a) R^{30} y R^{31} forman conjuntamente un doble enlace entre los átomos de N y C a los que están unidos; o
(b) R^{30} es H y R^{31} se selecciona de OH y OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4}.
(c) R^{30} y R^{31} son ambos H; o
(d) R^{31} es OH u OR^B, donde R^B es alquilo C_{1-4} y R^{30} se selecciona de:

(i)



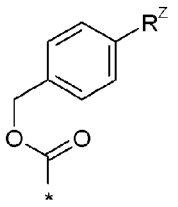
;

(ii)



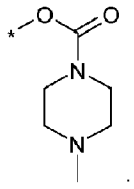
;

(iii)



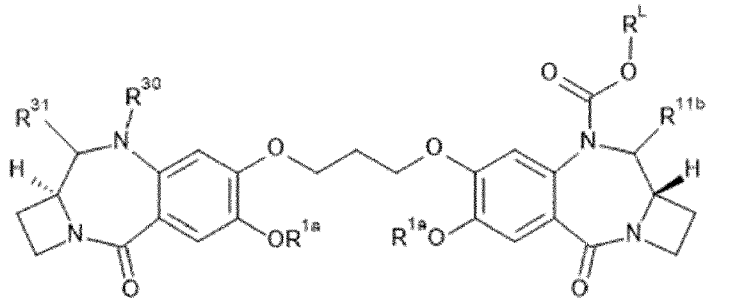
donde R^Z se selecciona de:

(z-i)

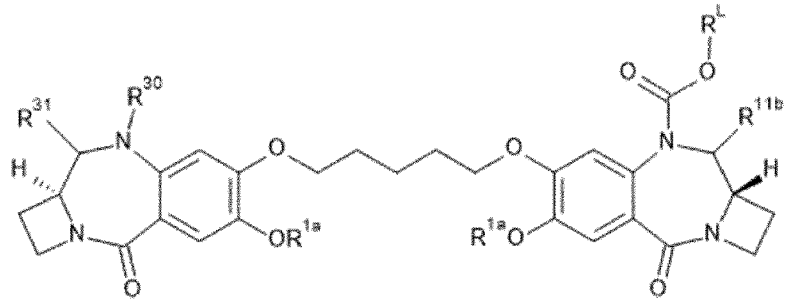


(z-ii) $OC(=O)CH_3$;
(z-iii) NO_2;
(z-iv) OMe;
(z-v) glucurónido;
(z-vi) $NH-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-C(=O)-R^{ZC}$, donde $-C(=O)-X_1-NH-$ y $-C(=O)-X_2-NH-$ representan residuos de aminoácidos naturales y R^{ZC} se selecciona de Me, OMe, CH_2CH_2OMe, y $(CH_2CH_2O)_2Me$.

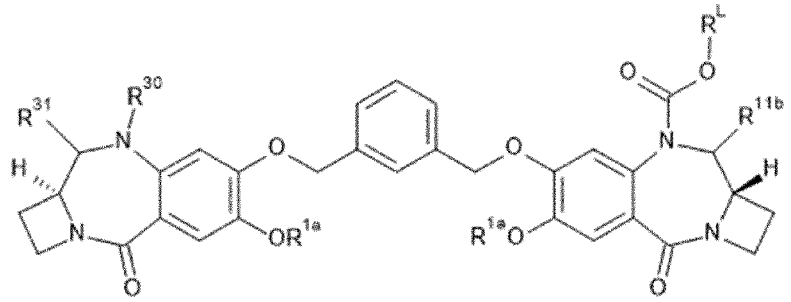
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, que es de fórmula Ia, Ib o Ic:



Ia



Ib



Ic

donde R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo.

6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde R^L es de fórmula IIIa, y:

a) Q es un residuo dipeptídico seleccionado de:

^{CO}-Phe-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Ala-^{NH},

^{CO}-Val-Lys-^{NH},

^{CO}-Ala-Lys-^{NH},

^{CO}-Val-Cit-^{NH},

^{CO}-Phe-Cit-^{NH},

^{CO}-Leu-Cit-^{NH},

^{CO}-Ile-Cit-^{NH},

^{CO}-Phe-Arg-^{NH},

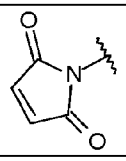
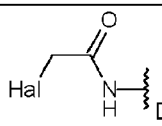
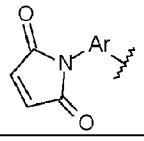
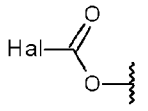
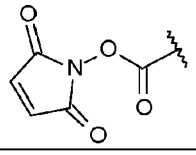
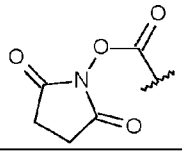
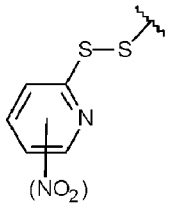
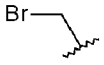
y

^{CO}-Trp-Cit-^{NH};

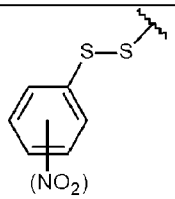
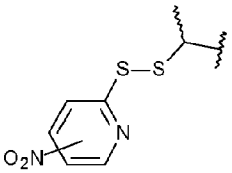
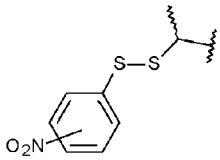
y/o

b) R^L es de fórmula IIIa y, a es 0, c es 1 y d es 2, y b es de 0 a 8 preferentemente en donde b es 0, 4 u 8.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde R^L es de fórmula IIIa y G^L se selecciona de:

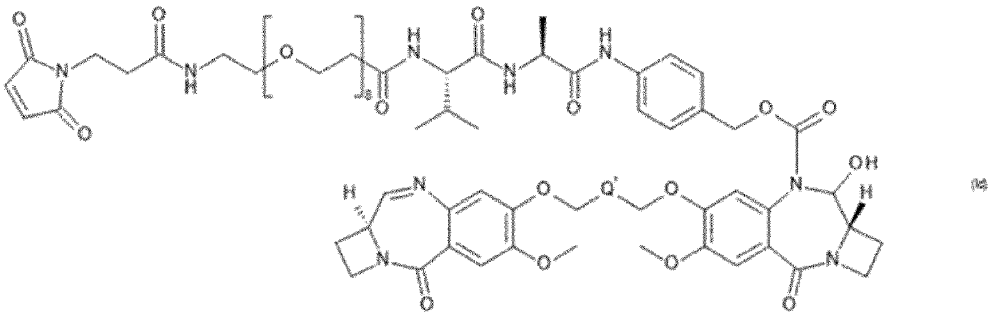
(G^{L1-1})		(G^{L4})	 Donde Hal = I, Br, Cl
(G^{L1-2})		(G^{L5})	
(GL2)		(GL6)	
(G^{L3-1})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(GL7)	

(continuación)

(G^{L3-2})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L8})	
(GL^{3-3})	 donde el grupo NO_2 es opcional	(G^{L9})	
(G^{L3-4})	 donde el grupo NO_2 es opcional		

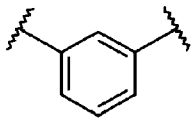
donde Ar representa fenileno.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el compuesto es de fórmula Id:



donde Q' se selecciona de:

(a) $-CH_2-$;
(b) $-C_3H_6-$; y
(c)

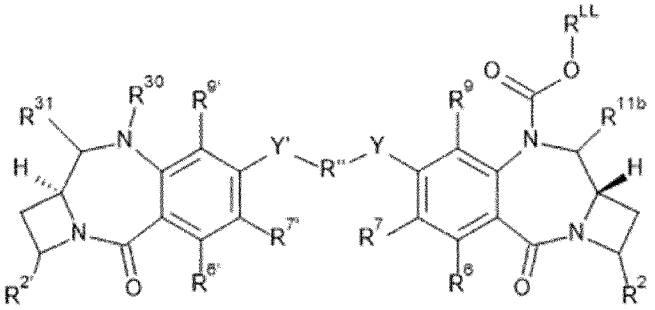


.

9. Un conjugado de fórmula II:

$$L - (D^L)_p \qquad (II)$$

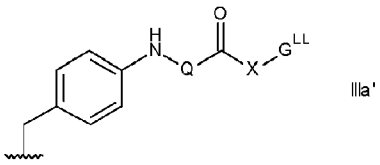
en donde L es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, D^L es una unidad de enlazador a fármaco de fórmula I*:



en donde:

Y, Y', R'', R^2, $R^{2'}$, R^6, $R^{6'}$, R^7, $R^{7'}$, R^9 y $R^{9'}$ son como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2;
R^{11b}, R^{30} y R^{31} son como se ha definido en la reivindicación 4;
R^{LL} es un enlazador para la conexión al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se selecciona de:

(iiia):

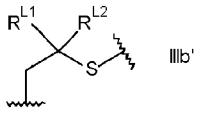


IIIa'

,

donde Q y X son como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6 y G^{LL} es un enlazador conectado a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo; y

(iiib):

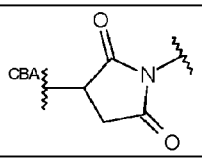
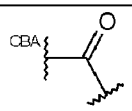
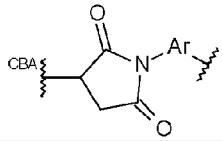
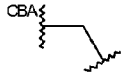
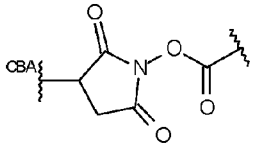
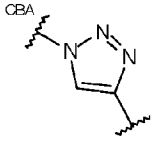
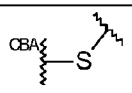
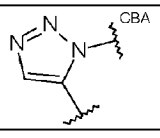


IIIb'

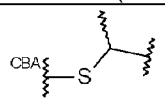
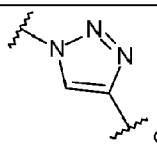
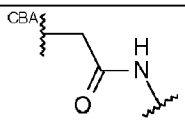
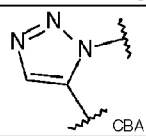
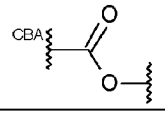
,

donde R^{L1} y R^{L2} son como se han definido en la reivindicación 4;
en donde p es un número entero de 1 a 20.

10. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 9, en donde G^{LL} se selecciona de:

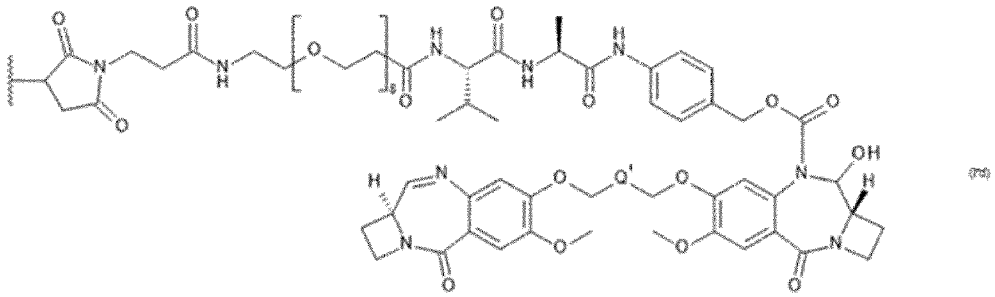
(G^{LL1-1})		(G^{LL6})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL7})	
(G^{LL2})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL8-2})	

(continuación)

(G^{LL3-2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL4})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL5})			

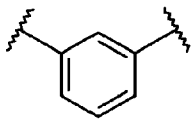
donde Ar representa fenileno.

11. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 9, en donde D^L es de fórmula (Id'):



donde Q' se selecciona de:

(a) $-CH_2-$;
(b) $-C_3H_6-$; y
(c)



.

12. Una composición que comprende una mezcla de conjugados de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el promedio de p en la mezcla de compuestos conjugados es de 1 a 8.

13. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en terapia.

14. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 y un diluyente, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.

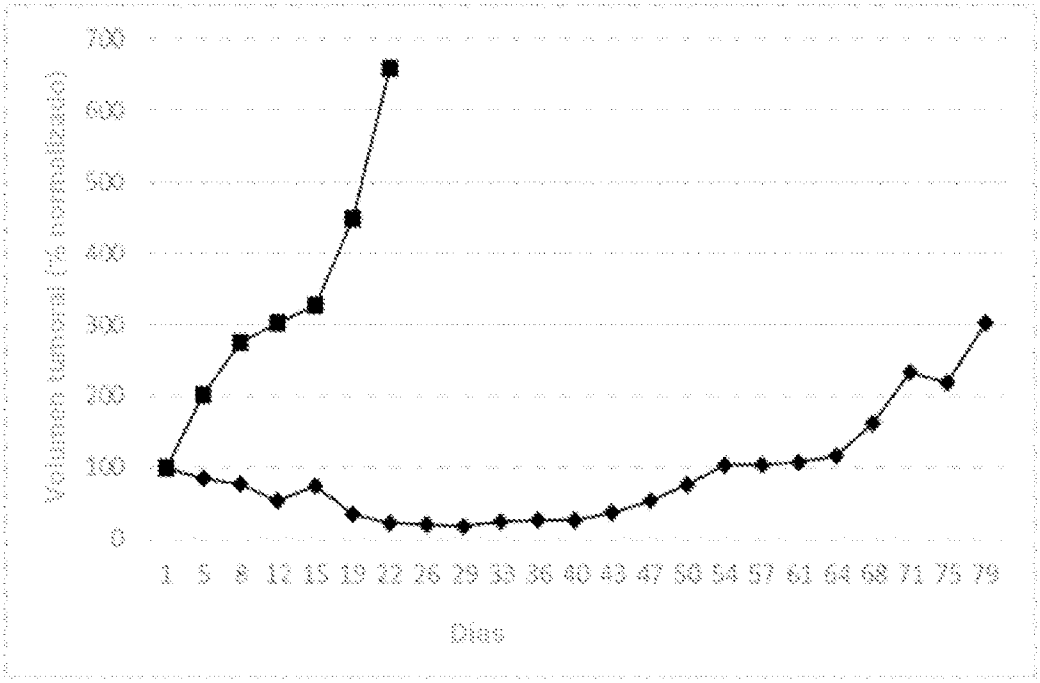

700
600
500
400
300
200
100
0
Volumen tumoral (% normalizado)
1 5 8 12 15 19 22 26 29 33 36 40 43 47 50 54 57 61 64 68 71 75 79
Días

Fig. 1