

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 322**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5365 (2006.01)

C07D 413/14 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014 PCT/US2014/052757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014 E 14766580 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 3038624**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden diastereómeros macrólidos, métodos para su síntesis y usos terapéuticos**

30 Prioridad:

26.08.2013 US 201361869954 P

31.01.2014 US 201461934313 P

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

26.11.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**NITTOI, THOMAS;
JAIN, NARESHKUMAR F. y
MARKOTAN, THOMAS PATRICK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 989 322 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden diastereómeros macrólidos, métodos para su síntesis y usos terapéuticos

5 Las enfermedades proliferativas se caracterizan por el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales. Si no se controla la diseminación de estas células, esto puede llevar a la muerte. Las enfermedades proliferativas, por ejemplo el cáncer, se pueden tratar mediante cirugía, radiación, quimioterapia, terapia basada en hormonas y/o inmunoterapia. Una serie de estos tratamientos, particularmente la quimioterapia, se basan en el uso de fármacos antiproliferativos que limitan la diseminación de las células anormales. Los medicamentos antiproliferativos, sin embargo, normalmente son indiscriminados en su capacidad de destruir células, y afectan tanto a las células normales como a las anormales basándose simplemente en si una célula se está replicando. Independientemente, la mayoría de los medicamentos antiproliferativos requieren una concentración relativamente alta en el lugar de la proliferación celular anormal para ser eficaces. Esta combinación de proporcionar suficiente fármaco antiproliferativo en un sitio de crecimiento celular anormal sin causar también una muerte significativa de células normales a nivel sistémico o en la proximidad de estas células es lo que aborda esta divulgación.

20 Se han intentado varios enfoques para la administración dirigida de fármacos, incluido el uso de conjugados de sondas dirigidas a tumores (tales como anticuerpos o factores de crecimiento) con toxinas tales como las toxinas de *Pseudomonas* o de la difteria. Los conjugados para su uso en el tratamiento del cáncer dirigen de este modo el fármaco antiproliferativo a una población de células anormales. Recientemente, se han empleado conjugados que incluyen la toxina maitansina para el tratamiento del cáncer. La maitansina ha demostrado una gran eficacia como agente antiproliferativo, pero la toxicidad del compuesto ha resultado problemática para las células normales. Existe la necesidad de desarrollar conjugados basados en maitansina que tengan suficiente actividad para su uso como tratamiento contra el cáncer. Cuanto más activo o eficaz sea el conjugado basado en maitansina para inhibir o destruir una población de células anormales, menor será la concentración necesaria de conjugado, siendo el beneficio un menor riesgo general de dañar las células normales.

30 Muchos compuestos antiproliferativos presentan estructuras asimétricas, tales como la familia maitansinoide de macrólidos, y por lo tanto pueden existir en forma de una mezcla racémica, en forma de enantiómeros separados con configuración "R" y "S", o (+) y (-), por centro estereogénico y varios diastereómeros. La presente divulgación muestra que la administración dirigida de un único diastereómero maitansinoide exhibe un perfil inhibitor de la proliferación celular mejorado en comparación con la administración de su respectiva mezcla de diastereómeros. Por consiguiente, los diastereómeros de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento se pueden utilizar para preparar medicamentos con un perfil terapéutico mejorado que pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades y afecciones específicas, particularmente el cáncer.

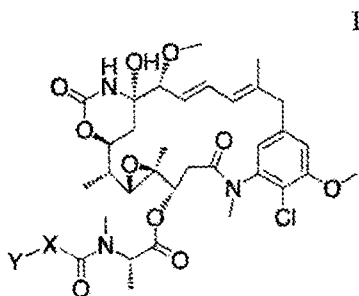
40 El documento WO 2010/126551 A1 divulga conectores para unir fármacos a agentes de unión celular. Los conectores se modifican para obtener conectores hidrófilos incorporando un espaciador de polietilenglicol. También se divulga un método para preparar maitansinoides que llevan un resto tioéter y un grupo reactivo que permite que el maitansinoide se una a un agente de unión celular esencialmente en una sola etapa.

45 El documento CN 103254311 A divulga un método para preparar un conjugado de anticuerpo-fármaco alcaloide de maitansina.

50 Robert Y. Zhao *et al.* ("Synthesis and Evaluation of Hydrophilic Linkers for Antibody-Maytansinoid Conjugates", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 54, n.º 10, 26 de mayo de 2011, (páginas 3606-3623) divulga la síntesis y la evaluación biológica de reticulantes heterobifuncionales hidrófilos para la conjugación de anticuerpos con agentes altamente citotóxicos.

La invención viene definida por las reivindicaciones.

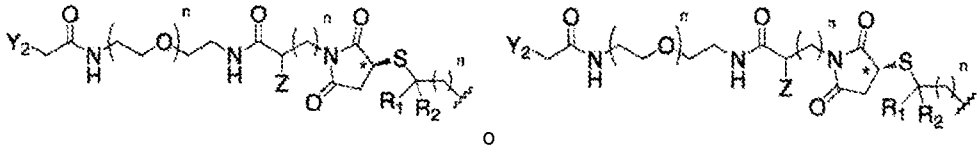
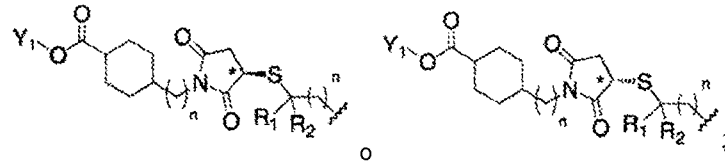
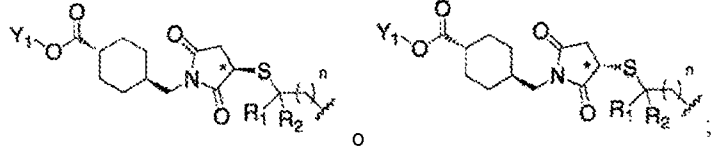
55 La presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco para la fórmula (I):



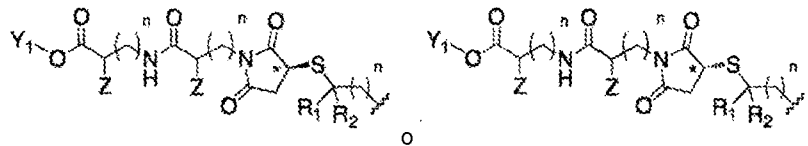
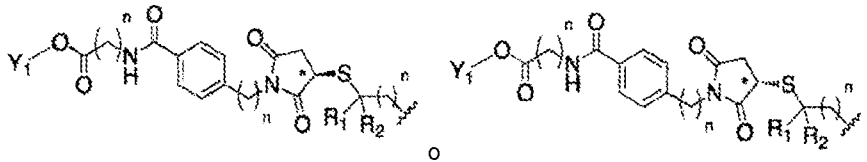
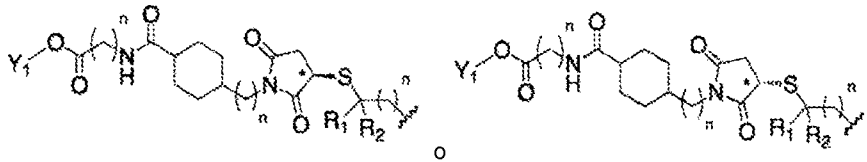
en donde:

X es

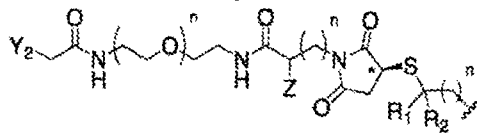
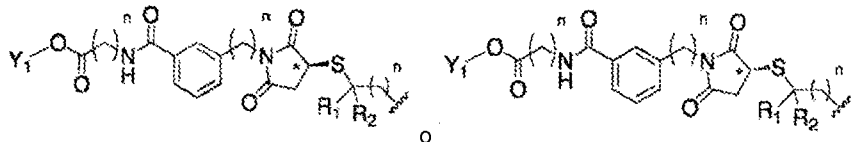
5



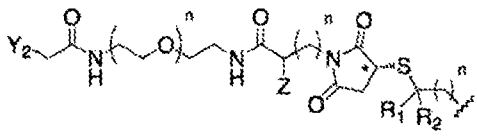
10

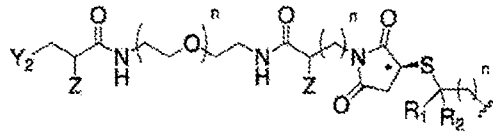


15

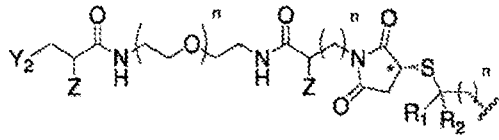


20

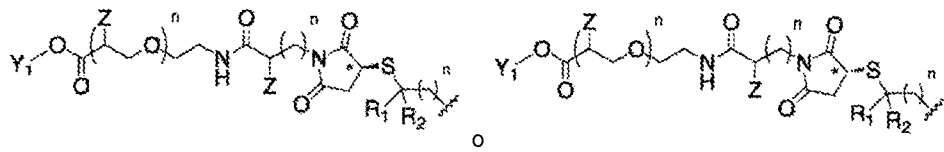




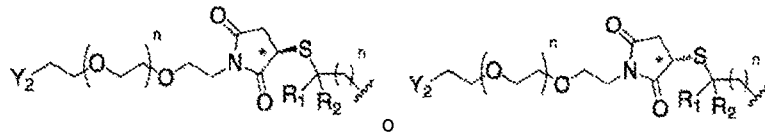
o



5

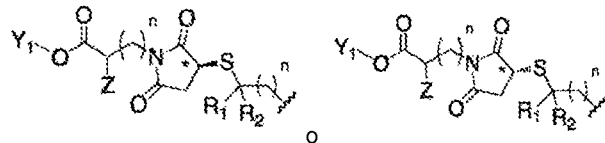


o

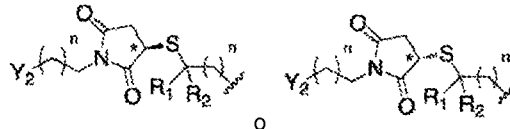


o

10



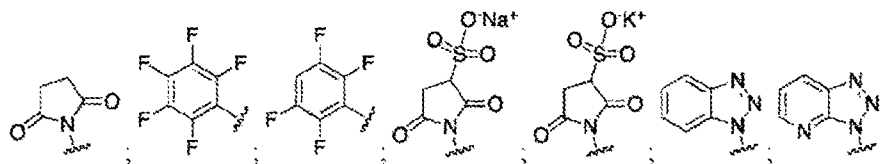
o



o

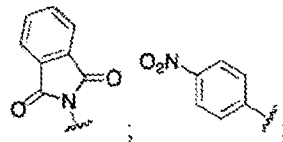
15

Y es Y₁ o Y₂ además en donde Y₁ es



20

o H;
Y₂ es -Cl, -Br, -I, o



25

Z es H o SO₃H;
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre H o alquilo;
n es independientemente 0 o un número entero de 1 a 50;

30

y en donde las moléculas de fármaco presentes en la composición comprenden una mezcla de al menos dos diastereómeros, un primer diastereómero y un segundo diastereómero, además

en donde dichos primer diastereómero y segundo diastereómero son por lo demás idénticos, excepto por que dichos primer y segundo diastereómeros tienen una configuración estereoquímica diferente en un carbono quiral representado por (*) en la fórmula X, en donde dicho átomo de carbono quiral es un átomo de carbono que está unido a un átomo de azufre, y dicho primer o segundo diastereómero está presente en un exceso diastereomérico de más del 50 %.

En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde n es 1, y R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno.

En otra realización, la composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más.

En determinadas realizaciones, las moléculas de fármaco de fórmula I están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 98 % a aproximadamente el 100 %.

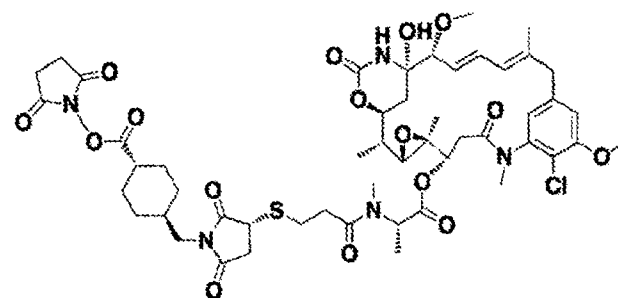
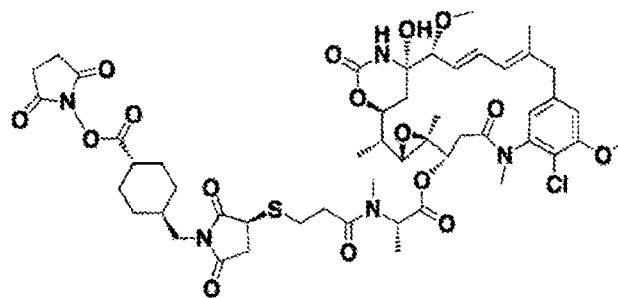
En otra realización, la composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I en donde uno de los al menos dos diastereómeros se caracteriza por un espectro de RMN de ¹H de la figura 1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se utiliza en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

En otra realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I en donde las moléculas de fármaco están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de más del 50 % y muestran una mayor actividad antiproliferativa que una composición correspondiente que comprende moléculas de fármaco de fórmula I que no están presentes en un exceso diastereomérico de más del 50 %.

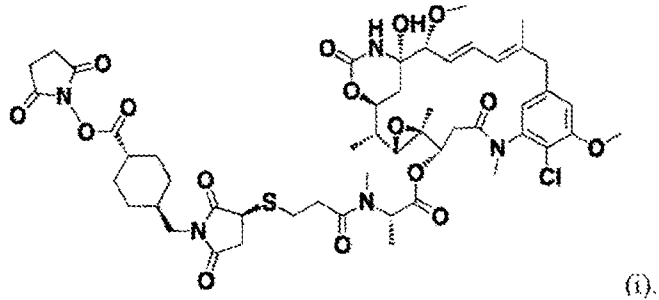
Por otra parte, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I que comprenden además una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente o agente adicional que incluye, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio, un antibiótico y similares.

En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I representadas por la siguiente estructura:

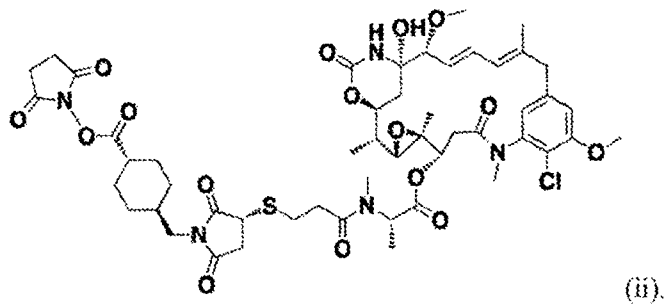


o mezclas de las mismas en un exceso diastereomérico de más del 50 %.

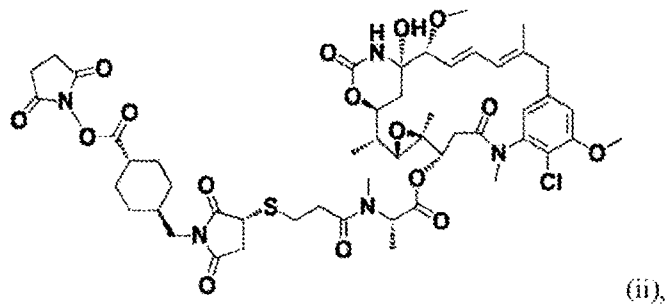
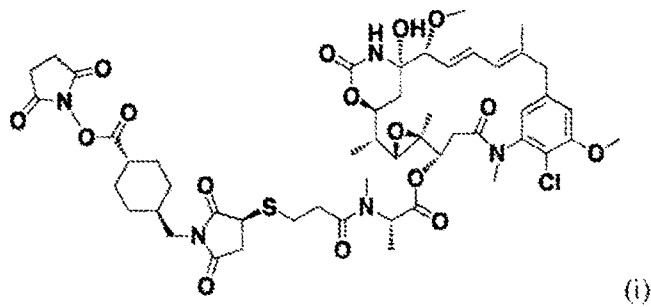
En una realización, uno de los al menos dos diastereómeros es un compuesto de fórmula (i)



5 En otra realización, uno de los al menos dos diastereómeros es un compuesto de fórmula (ii)

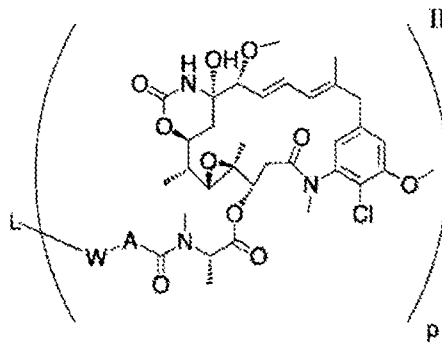


10 La presente divulgación también proporciona un compuesto de fórmula (i) o (ii),



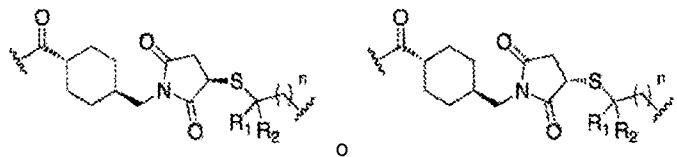
15 en donde el compuesto es estereoméricamente puro.

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula (II):



en donde:

5 A es



10 W se selecciona entre S, O, o NR₃;

L es un ligando;

en donde adicionalmente:

15 L es capaz de unirse a una célula o población de células;

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan cada uno independientemente entre H o alquilo;

en donde n es 0 o un número entero de 1 a 10;

p es un número entero de 1 a 10;

y en donde los conjugados de ligando-fármaco están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de más del 50 %.

20 En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II, en donde n es 1, y R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno.

25 En una realización, las composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más. En determinadas realizaciones, las moléculas del fármaco de fórmula II están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 100 %, o de aproximadamente el 98 % a aproximadamente el 100 %.

30 En otra realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II en las composiciones en un exceso diastereomérico de más del 50 % y muestran una mayor actividad antiproliferativa que una composición correspondiente que comprende conjugados de ligando-fármaco de fórmula II que no están presentes en un exceso diastereomérico de más del 50 %.

35 En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II, en donde el ligando es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se puede desarrollar para unirse específicamente a un antígeno asociado a un tumor. Con respecto a la fórmula II, n puede ser 1 y R₁ y R₂ puede ser cada uno independientemente un hidrógeno.

40 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II, en donde el ligando es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor, y los conjugados de ligando-fármaco están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de más de aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más.

45 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmula II, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor y además en donde el antígeno asociado a un tumor se selecciona del grupo que consiste en AFP, ALK, proteínas BAGE, β-catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa

carbónica IX, caspasa-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 y -12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene secuencias de aminoácidos que difieren de los anticuerpos mencionados anteriormente pero que conservan la capacidad de unirse a un determinado antígeno asociado a un tumor. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo variantes pueden comprender una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero presentan una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos.

15 Dos conjugados se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, bien en una sola dosis o en múltiples dosis. Algunos conjugados se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para obtener las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente irrelevantes para el fármaco estudiado en concreto.

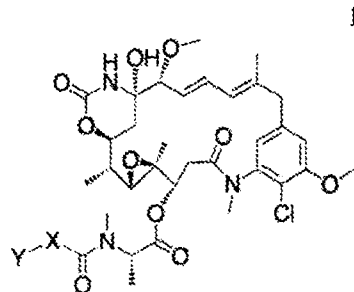
25 En una realización, dos conjugados son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia.

30 En una realización, dos conjugados son bioequivalentes si se puede cambiar a un paciente una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin que se espere un aumento del riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad o una menor eficacia, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

35 En una realización, dos conjugados son bioequivalentes si ambos actúan mediante un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la afección o afecciones de uso, en la medida en que se conozcan dichos mecanismos.

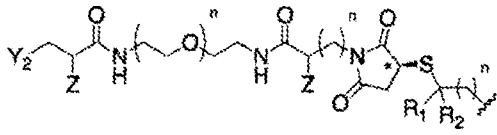
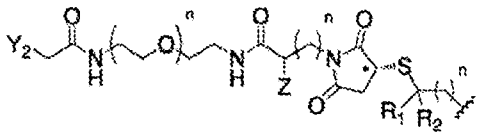
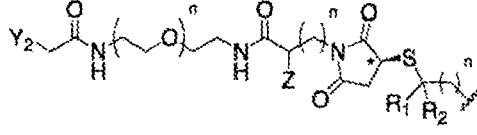
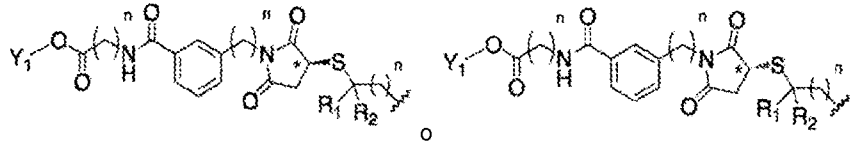
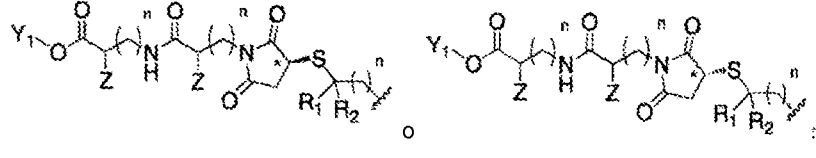
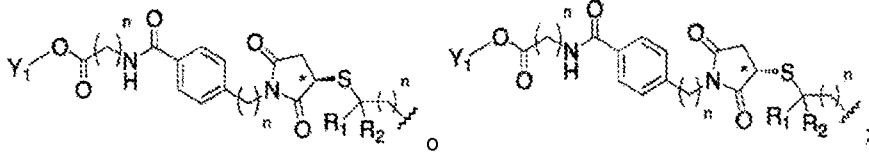
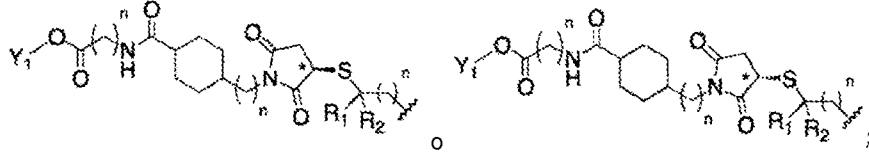
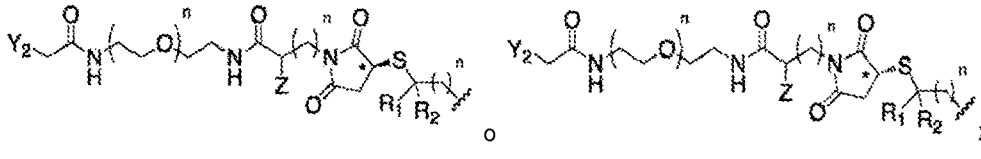
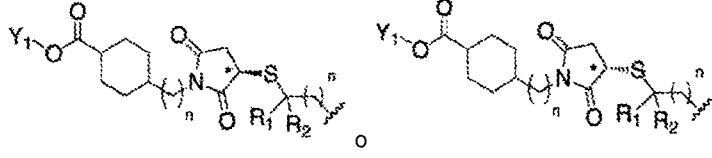
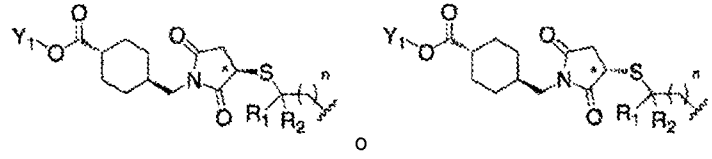
40 La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en donde se mide la concentración del conjugado o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que se ha correlacionado con, y es razonablemente predictivo, de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en donde se mide el efecto farmacológico inmediato adecuado del conjugado (o su diana) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un conjugado.

45 La presente divulgación también proporciona un nuevo método para la preparación de una composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula (I):



en donde:

50 X es

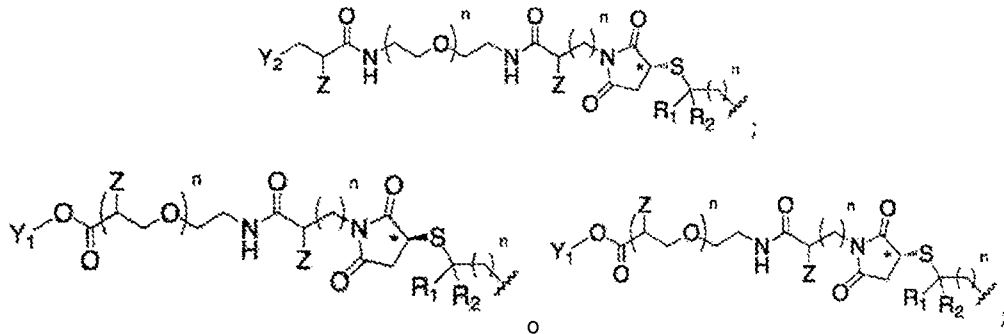


5

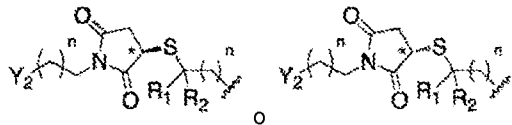
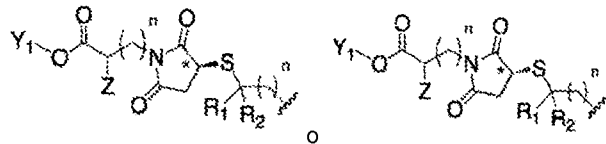
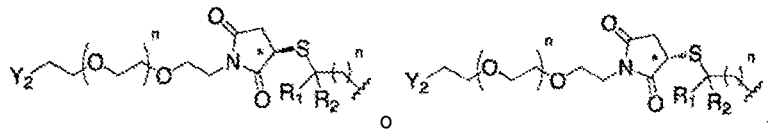
10

15

20

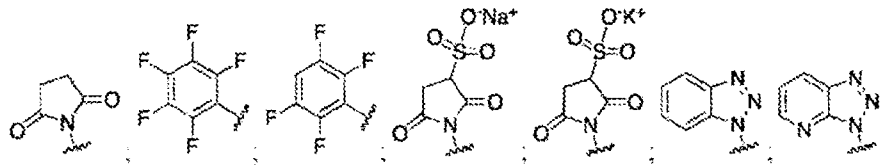


5

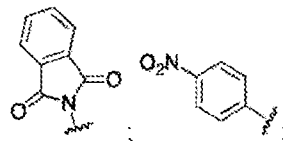


10

Y es Y₁ o Y₂ y además en donde
Y₁ es

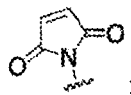


15



20

o H;
Y₂ es -Cl, -Br, -I, o



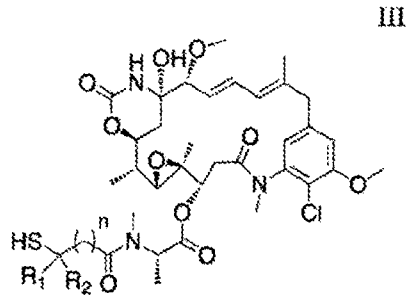
25

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre H o alquilo;
n es independientemente 0 o un número entero de 1 a 50;
y en donde las moléculas de fármaco presentes en la composición comprenden una mezcla de al menos dos diastereómeros, un primer diastereómero y un segundo diastereómero, y además en donde dichos primer diastereómero y segundo diastereómero son por lo demás idénticos, excepto por que dichos primer y segundo diastereómeros tienen una configuración estereoquímica diferente en un carbono quiral representado por (*) en la fórmula X, en donde dicho átomo de carbono quiral es un átomo de carbono que está unido a un átomo de azufre, y dicho primer o segundo diastereómero está presente en un exceso diastereomérico de más del 50 %, comprendiendo el método:

30

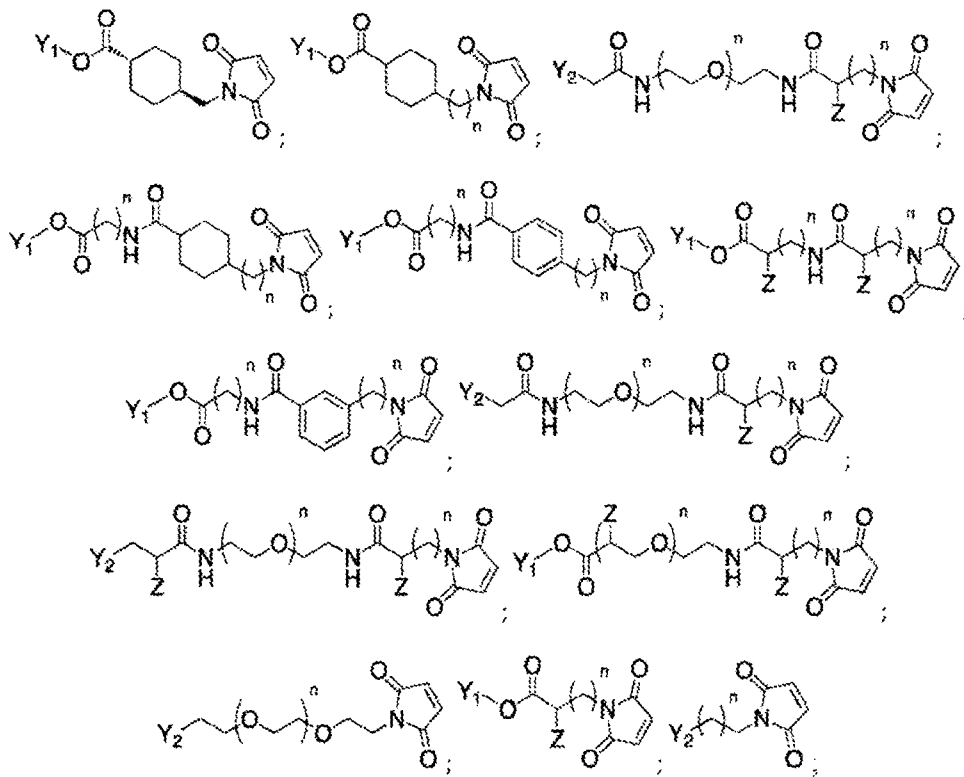
(a) proporcionar una mezcla que comprende

(i) un material de partida que tiene una fórmula III:



5

(ii) un compuesto de fórmula IV:

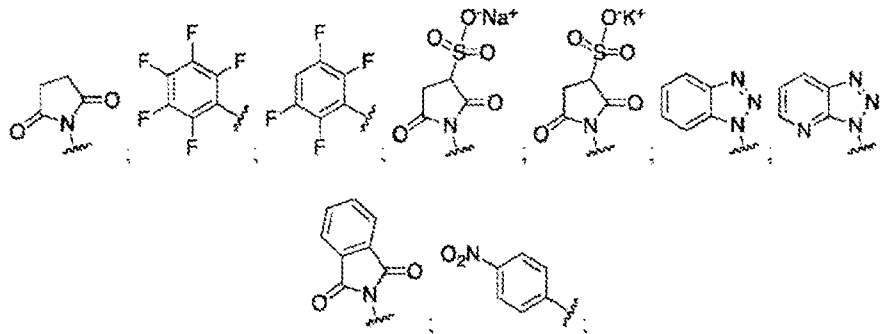


10

15

20

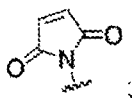
Y₁ es



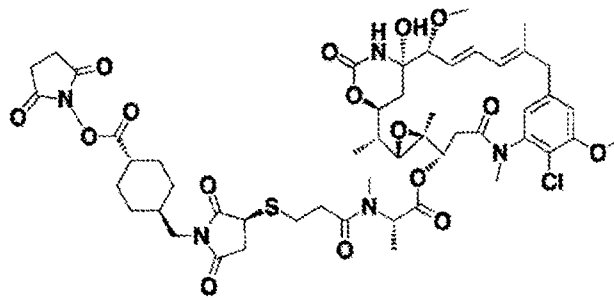
25

o H;

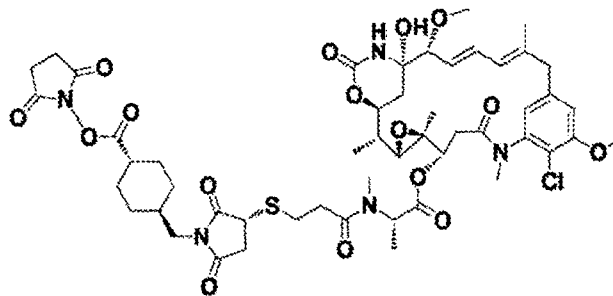
Y₂ es -Cl, -Br, -I, o



- Z es H o SO₃H;
R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre H o alquilo; y
n es independientemente 0 o un número entero de 1 a 50;
- (iii) un disolvente orgánico,
(iv) agua, y
(v) un sustrato sólido;
- (b) dejar que la mezcla de la etapa (a) reaccione hasta que parte del material de partida se convierta en el compuesto de fórmula I; y
(c) retirar el compuesto bruto de fórmula I de la mezcla de la etapa (b).
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar una composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el método comprende además la etapa (d), y además en donde la etapa (d) comprende purificar el compuesto de fórmula I obtenido en la etapa (c) tal como se ha explicado anteriormente.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el sustrato sólido se selecciona del grupo que consiste en gel de sílice, celite, alúmina, una zeolita y tamices moleculares triturados. También se pueden utilizar otros sustratos sólidos similares siempre que el sustrato sólido permita el posicionamiento adecuado del macrólido III para permitir la adición estereoselectiva de la maleimida IV.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde n es 1, y R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el disolvente orgánico comprende un disolvente aprótico polar tal como DMF, DMA, HMPT, NMP, acetonitrilo, dioxano, acetona, DMSO, THF, acetato de etilo, acetato de metilo, cloruro de metileno, carbonato de propileno o mezclas de los mismos.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el disolvente aprótico polar comprende acetonitrilo.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el disolvente orgánico y el agua están presentes en una proporción de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde la proporción molar del material de partida que tiene la fórmula III y el compuesto de fórmula IV es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, que comprende además combinar el compuesto de fórmula I con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco.
- En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde el compuesto de fórmula I está unido al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de un S, O o NR₃.
- En una realización, la divulgación proporciona un método para preparar una composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, en donde las moléculas de fármaco de fórmula I están presentes en la composición en un exceso diastereomérico de aproximadamente el 60 %, 70 %, el 80 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más.
- En una realización, la divulgación proporciona un método para preparar composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I representadas por la siguiente estructura:



o



5

en un exceso diastereoselectivo de más del 50 %. Aunque en los ejemplos de trabajo del presente documento se exponen determinados métodos ilustrativos para preparar las composiciones de la presente invención, se contemplan otros métodos dentro del alcance de la presente invención tales como, por ejemplo, separación cromatográfica de una mezcla racémica o de una mezcla de diastereómeros (por ejemplo, HPLC en fase estacionaria normal, inversa o quiral utilizando mezclas de disolventes apróticos polares, etc.).

10

La presente divulgación también se refiere a composiciones en las que una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I, o los conjugados de ligando-fármaco de fórmula II, están contenidos en las composiciones en una cantidad terapéuticamente eficaz y que comprenden además un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15

En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula II que comprenden además una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente quimioterapéutico.

20

En numerosas realizaciones, las composiciones comprenden un compuesto de fórmula (I) y/o (II) de la presente divulgación que se puede administrar en combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales. La administración conjunta y la terapia de combinación no se limitan a la administración simultánea, por separado o en conjunto, sino que también incluye administraciones secuenciales.

25

La terapia combinada incluye la administración de una formulación de dosificación farmacéutica única que contiene una composición que comprende uno o más compuestos de fórmula (I) y/o (II) y uno o más agentes terapéuticos adicionales; así como la administración de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o (II) de la presente divulgación y uno o más agentes adicionales en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o (II) y un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento se pueden administrar al paciente conjuntamente en una composición de dosificación única tal como una formulación combinada, o cada agente se puede administrar en una formulación de dosificación separada. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o (II) y uno o más agentes adicionales se puede administrar simultáneamente o por separado en tiempos escalonados, es decir, secuencialmente.

35

Ejemplos no limitantes de dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen inhibidores de citocinas (por ejemplo, un inhibidor de la interleucina-1 (IL-1) (tal como rilonacept o anakinra, un antagonista de IL-1 de molécula pequeña, o un anticuerpo anti-IL-1); un inhibidor de IL-18 (tal como un antagonista de IL-18 de molécula pequeña o un anticuerpo anti-IL-18); un inhibidor de IL-4 (tal como un antagonista de IL-4 de molécula pequeña, un anticuerpo anti-IL-4 o un anticuerpo anti-receptor de IL-4, un Inhibidor de IL-6 (tal como un antagonista de IL-6 de molécula pequeña, un anticuerpo anti-IL-6 o un anticuerpo anti-receptor de IL-6); aspirina; AINE; esteroides (por ejemplo, prednisona, metotrexato, etc.); ciclosporina A en dosis bajas; factor de necrosis tumoral (TNF) o inhibidores del receptor de TNF (por ejemplo, un antagonista del TNF o TNFR de molécula pequeña o un anticuerpo anti-TNF o TNFR); inhibidores de la síntesis de ácido úrico (por ejemplo, alopurinol); promotores de la excreción de ácido úrico (por ejemplo, probenecid, sulfipirazona, benzbromarona, etc.); otros inhibidores de la inflamación (por ejemplo, inhibidores de la caspasa-1, p38, IKK1/2, CTLA-4lg, etc.); y/o corticosteroides. El agente o agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar

45

antes, simultáneamente, o después de la administración del uno o más compuestos de fórmula (I) y/o (II) (para los fines de la presente divulgación, dichas pautas posológicas se consideran la administración de uno o más compuestos de fórmula (I) y/o (II) "en combinación con" un agente terapéutico).

- 5 La expresión "agente citotóxico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.
- 10 Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiadrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (TAXOTERE®, Aventis Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales tales como antiestrógenos, que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal en tumores, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.
- 45 Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa ya sea *in vitro* o *in vivo*. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en la fase G1 y la detención en la fase M. Bloqueadores de la fase M clásicos incluyen los agentes de la vinca (vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen la fase G1 también se pasan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y Ara-C.

55 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que ha sido aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de Estados Unidos o que figura en la farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Algunos excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos,

5 formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos convencionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados.

10 En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición se ha de administrar por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contenga agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los principios pueden mezclarse antes de la administración.

15 Los agentes activos de la divulgación pueden formularse en sus formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

20 La cantidad del agente activo de la divulgación, que será eficaz en el tratamiento de una afección médica, puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales basadas en la presente descripción. De manera adicional, pueden emplearse de manera opcional ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vida de administración y la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 0,5 a 20 miligramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos adecuados de dosificación para administración intranasal generalmente son de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o animales.

30 En una realización, la divulgación proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o (II) para su uso en un método de tratamiento de un trastorno médico, el compuesto para su uso secuencial o consecutivo con una terapia adicional o al menos un agente terapéutico adicional.

35 En otra realización, la divulgación se refiere a la composición que comprende un compuesto de fórmula (I) y/o (II) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad, en donde la composición es para uso parenteral.

40 La presente divulgación incluye además una composición que comprende compuestos de fórmula (I), fórmula (II), fórmula (i), fórmula (ii), o una combinación de los mismos y/o formulaciones farmacéuticas de las mismas para su uso en el tratamiento, la prevención y/o la mejora de un trastorno médico.

45 La presente divulgación incluye además una composición que comprende compuestos de fórmula (I), fórmula (II), fórmula (i), fórmula (ii), o una combinación de los mismos y/o formulaciones farmacéuticas de las mismas para su uso en el tratamiento, la prevención y/o la mejora de un tumor.

50 Si bien las realizaciones del presente documento se han descrito predominantemente con relación a trastornos antiproliferativos tales como el cáncer, se prevé que las composiciones del presente documento también puedan ser útiles en el tratamiento de un trastorno médico seleccionado entre enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades y disfunciones inmunológicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos óseos y enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, cualquier trastorno que pueda beneficiarse de la administración dirigida de una sustancia tóxica a células, tipos celulares, tejidos y/o órganos particulares está dentro del alcance de la presente invención.

55 Finalmente, las realizaciones del presente documento pueden incluir composiciones que comprenden mezclas de compuestos como los representados por la fórmula (I) y la fórmula (II).

60 Los términos y expresiones "comprender", "que comprende", "incluir" y "que incluye", cuando se utilizan en esta memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones pretenden especificar la presencia de las características, números enteros, componentes o etapas mencionadas, pero estos no excluyen la presencia ni la adición de otra u otras características, números enteros, componentes, o etapas adicionales de los mismos.

El término "conjugado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que tiene un ligando, un conector y una molécula biológicamente activa. Ejemplos ilustrativos incluyen compuestos de fórmula (II).

65 El término "espaciador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a los componentes químicos básicos del conector utilizados para separar espacialmente el ligando de la molécula biológicamente activa y permitir el

catabolismo del conector dentro de las células.

El término "macrórido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula biológicamente activa que tiene un anillo macrórido.

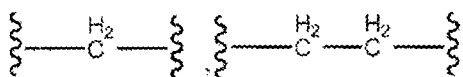
5 El símbolo



10 representa el punto de unión.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarbonado que tiene una cadena lineal o ramificada o combinaciones de las mismas. Los radicales alquilo pueden ser un radical univalente, bivalente o cíclico. Ejemplos de radicales alquilo univalentes son metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo y similares. A modo de ilustración, ejemplos de radicales alquilo bivalentes incluyen

15



20 Ejemplos de radicales alquilo cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. Los radicales alquilo típicos tienen de uno a diez átomos de carbono, de uno a nueve átomos de carbono, de uno a ocho átomos de carbono, de uno a siete átomos de carbono, de uno a seis átomos de carbono, de uno a cinco átomos de carbono, de uno a cuatro átomos de carbono, de uno a tres átomos de carbono, uno a dos átomos de carbono o un átomo de carbono. Cicloalquilos típicos son radicales de anillos monocíclicos de 3 a 7 miembros.

25 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto a sales orgánicas como a sales inorgánicas de los compuestos conjugados descritos en el presente documento, por ejemplo, compuestos de fórmula (I) y (II). Las sales son farmacéuticamente aceptables e incluyen: sulfato, citrato, nitrato, fosfato, ascorbato, bromuro, gluconato, benzoato, oxalato, pantotenato y similares. Cabe señalar que las sales farmacéuticamente aceptables del presente documento pueden incluir más de un átomo cargado en su estructura, así como uno o más contraiones. La preparación de compuestos conjugados del presente documento como sales farmacéuticamente aceptables es bien conocida por un experto en la materia.

30

El término "ligando", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula o compuesto que interactúa específica o selectivamente con una segunda molécula o compuesto y/o se une a ella. En determinadas realizaciones, un ligando es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Otros ejemplos de ligandos adecuados para su uso en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, aptámeros, péptidos que interactúan de manera específica con un antígeno particular (por ejemplo, peptidocuerpos), moléculas receptoras y estructuras de soporte de unión a antígeno (por ejemplo, DARPin, proteínas de repetición HEAT, proteínas de repetición ARM, proteínas de repetición de tetratricopéptidos y otras estructuras de soporte basadas en proteínas de repetición de origen natural, etc., [véase, por ejemplo, Boersma y Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857] y las referencias citadas en el mismo]).

35 40

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o en forma de varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de esta forma el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra. Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto en la técnica apreciará que dichos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* bien químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, incluye también fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, dominios variables únicos (Dabs) de Fv monocatenario (scFv)) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de visualización tales como bibliotecas de visualización de fagos, *E. coli* o levaduras (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348: 552-554).

45 50 55

Los métodos para preparar anticuerpos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.). Anticuerpos que se aíslan de organismos distintos de los humanos, tales como ratones, ratas, conejos, vacas, se pueden hacer más parecidos a los humanos a través de quimerización o humanización.

60

Se entiende que la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos

que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana. Los mAb humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir mAb en los que se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero en secuencias FR humanas.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que produce el efecto deseado para el cual se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la materia podrá determinarla usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

El término "racemato" tal como se usa en el presente documento, significa una mezcla equimolar de un par de enantiómeros. El término racemato también se refiere a una mezcla racémica.

El término "enantiómero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Los enantiómeros pueden existir en la configuración (R) o (S).

La expresión "síntesis estereoselectiva" se refiere a una reacción química que conduce a la formación de un estereoisómero único o una mezcla de isómeros enriquecida en enantiómero entre dos o más estereoisómeros posibles.

La expresión "exceso diastereomérico" se refiere a la diferencia entre la fracción molar del diastereómero único deseado en comparación con los diastereómeros restantes en una composición. El exceso diastereomérico se calcula de la siguiente manera:

(cantidad de un diastereómero único)-(cantidad de otros diastereómeros)/1. Por ejemplo, una composición que contiene el 90 % de 1 y el 10 % de 2, 3, 4, o una mezcla de los mismos tiene un exceso diastereomérico del 80 % [(90-10)/1]. Una composición que contiene el 95 % de 1 y el 5 % de 2, 3, 4, o una mezcla de los mismos tiene un exceso diastereomérico del 90 % [(95-5)/1]. Una composición que contiene el 99 % de 1 y el 1 % de 2, 3, 4, o una mezcla de los mismos tiene un exceso diastereomérico del 98 % [(99-1)/1]. El exceso diastereomérico se puede calcular de manera similar para cualquiera de 1, 2, 3 o 4.

La expresión "estereoméricamente puro", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto en donde el estereoisómero indicado está presente en mayor medida que otros estereoisómeros de ese compuesto, por ejemplo, el compuesto está presente en exceso diastereomérico. En algunas realizaciones, los compuestos estereoméricamente puros descritos en el presente documento comprenden el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, o el 97 % o más en peso de un estereoisómero del compuesto.

Los conjugados de acuerdo con diversas realizaciones descritas en el presente documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. En los ejemplos siguientes se proporciona un protocolo ilustrativo para producir conjugados.

En una realización, los conjugados se pueden preparar i) haciendo reaccionar un ligando con moléculas de fármaco de fórmula (I) para formar un conjugado de fórmula (II), y ii) purificando el conjugado.

En una realización alternativa, los conjugados se preparan haciendo reaccionar un ligando, un conector y un macróido biológicamente activo en una sola reacción. Una vez preparados los conjugados de acuerdo con la invención estos se pueden purificar.

En una realización, las composiciones que comprenden moléculas de fármacos de fórmula (I) y/o composiciones que comprenden compuestos conjugados de fórmula (II) descritos en el presente documento se pueden evaluar para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de varias estirpes celulares de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones que comprenden moléculas de fármacos de fórmula (I) y/o composiciones que comprenden compuestos conjugados de fórmula (II) se pueden aplicar *in vitro* a células de cáncer cultivadas en placa durante un número predeterminado de días y las células supervivientes se pueden medir en ensayos mediante métodos conocidos.

La descripción y los ejemplos presentados a continuación se proporcionan para ilustrar la invención en cuestión. Un experto en la materia reconocerá que estos ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración y no se incluyen con el propósito de limitar la invención. Tal como se ha indicado anteriormente, la invención viene definida por las reivindicaciones.

Las realizaciones descritas en el presente documento se ilustran con mayor detalle por medio de los ejemplos no limitantes que se describen a continuación. Tal como se ha indicado anteriormente, la invención viene definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra un espectro de RMN de ^1H de maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-*trans*-carboxisuccinato (**5**). El espectro de RMN de ^1H es consistente con un único diastereómero presente en al menos un 95 % de exceso diastereomérico ya que el espectro no está complicado por resonancias atribuibles al otro diastereómero. (A efectos comparativos, el ejemplo 2 establece el espectro de RMN de ^1H de la mezcla de diastereómeros).

La figura 2 ilustra un espectro de RMN de ^1H de una mezcla de diastereoisómeros de maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-*trans*-carboxisuccinato (**6**).

La figura 3 ilustra que en células SKBR3 el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (lotes *in vitro* e *in vivo*) tenía un valor de Cl_{50} de 0,3 nM frente a 0,9 nM para el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros HER2-6.

La figura 4 ilustra que en las células BT474 el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (*in vitro*) tenía un valor de Cl_{50} de 4,6 nM mientras que el lote HER2-5 (*in vivo*) tenía un valor de Cl_{50} de 4,0 nM frente a 11,6 nM para el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros HER2-6.

La figura 5 ilustra que en células NCI-N87 el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (*in vitro*) tenía un valor de Cl_{50} de 0,6 nM mientras que el lote HER2-5 (*in vivo*) tenía un valor de Cl_{50} de 0,4 nM frente a 1,0 nM para el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros HER2-6.

La figura 6 ilustra que en células HEK293/hEGFRVIII el conjugado del compuesto diastereómero único EGFRVIII-5 tenía un valor de Cl_{50} de 0,4 nM mientras que el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros EGFRVIII-6 tenía un valor de Cl_{50} de 0,5 nM.

La figura 7 ilustra que en células MMT/hEGFRVIII el conjugado del compuesto diastereómero único EGFRVIII-5 tenía un valor de Cl_{50} de 0,5 nM mientras que el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros EGFRVIII-6 tenía un valor de Cl_{50} de 9,8 nM, casi 20 veces mayor.

La figura 8 ilustra que en células U251/hEGFRVIII el conjugado del compuesto diastereómero único EGFRVIII-5 tenía un valor de Cl_{50} de 2,4 nM mientras que el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros EGFRVIII-6 tenía un valor de Cl_{50} de 3,3 nM.

La figura 9 ilustra que en células Ovar-3 el conjugado del compuesto diastereómero único MUC16-5 tenía un valor de Cl_{50} de 6,3 nM mientras que el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros MUC16-6 tenía un valor de Cl_{50} de 16,0 nM.

La figura 10 ilustra que en células PC3/MUC16long el conjugado del compuesto diastereómero único MUC16-5 tenía un valor de Cl_{50} de 0,34 nM mientras que el conjugado de la mezcla de diastereoisómeros MUC16-6 tenía un valor de Cl_{50} de 0,80 nM.

La figura 11 ilustra las curvas de crecimiento tumoral en ratones después de la dosificación con HER2-5 y reactivos de control. Los ratones recibieron el vehículo PBS (■), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DM1-SMe (●) y mAb de control de isotipo a 15 mg/kg (▼). Los ratones también recibieron mAb HER2 (▲), HER2-5 (△) y control de isotipo-5 (∇) en dosis de 1 mg/kg (A), 5 mg/kg (B) y 15 mg/kg (C). Los ratones recibieron 3 dosis semanales de conjugados y agentes de control, tal como indican las flechas negras (↑. Los grupos son N = 8, Media \pm ET).

La figura 12 ilustra el cambio de volumen del tumor (VT) después de la dosificación con HER2-5 y reactivos de control al finalizar el grupo de control de vehículo PBS el día 79 tras la implantación del tumor. Se muestran los tamaños de tumores individuales para cada grupo de dosificación. Los ratones recibieron el vehículo PBS (■), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DM1-SMe (●) y mAb de control de isotipo a 15 mg/kg (▼). Los ratones también recibieron mAb HER2 (A), HER2-5 (△) y control de isotipo-5 (V) en dosis de 1 mg/kg (A), 5 mg/kg (B) y 15 mg/kg (C). Los grupos son N = 8, Media \pm DT.

La figura 13 ilustra el cambio porcentual del peso de los animales después de la dosificación con HER2-5 y reactivos de control. Los ratones recibieron el vehículo PBS (■), 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de DM1-SMe (●) y mAb de control de isotipo a 15 mg/kg (▼). Los ratones también recibieron mAb HER2 (A), HER2-5 (△) y control de isotipo-5 (∇) en dosis de 1 mg/kg (A), 5 mg/kg (B) y 15 mg/kg (C). Los ratones recibieron 3 dosis semanales de conjugados y agentes de control, tal como indican las flechas negras (↑. Los grupos son N = 8, Media \pm ET).

Ejemplos

Detalles experimentales

Los espectros de RMN de protones (para compuestos que no pudieron detectarse mediante UV) se adquirieron en un instrumento Varian Inova de 300 MHz, mientras que los espectros de masas se recogieron en un dispositivo LC/MSD Agilent serie 1100 con fuente de ionización por electronebulización y analizador de trampa de iones y de cuadrupolo. Todos los conjugados se analizaron utilizando un espectrómetro de masas Bruker ultraFlexTreme MALDI-TOF. Todos los materiales de partida y disolventes se adquirieron en el mercado y se utilizaron sin purificación, salvo que se indicara lo contrario.

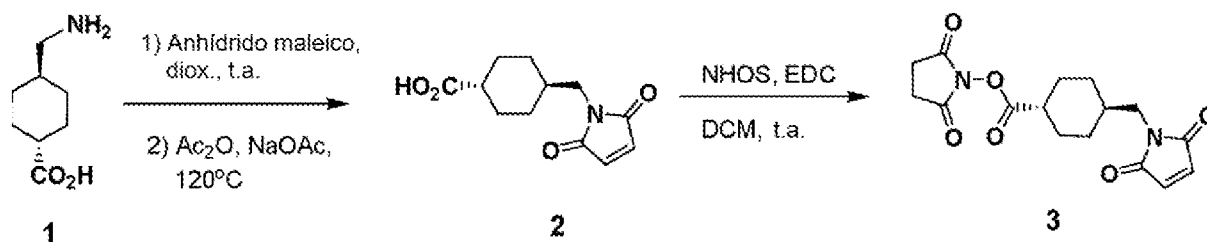
EJEMPLO 1

Síntesis de maleimidimetil-4-*trans*-ciclohexilcarboxi-succinato (3): Ácido maleimidimetil-4-*trans*-ciclohexanocarboxílico (2): El compuesto del título se preparó en dos etapas (etapa A y etapa B) utilizando versiones modificadas de los métodos descritos por Marnett *et al.* (*J. Med. Chem.*, 1996, 39, 1692-1670).

Etapa A: Una solución de ácido *trans*-4-aminociclohexano carboxílico (7,00 g, 44,5 mmol) en 1,4-dioxano (70 ml) se trató con anhídrido maleico (4,89 g, 49,9 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. La reacción se evaporó al vacío hasta obtener un sólido blanco que se puede almacenar o llevar a la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,11 (m, 1H), 6,44 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 6,24 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 3,05 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 2,13 (tt, 1H, $J = 12$ Hz, 4 Hz), 1,90 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,44 (m, 1H), 1,28 (m, 2H), 0,96 (m, 2H).

Etapa B: El ácido maleámico de la etapa A (36,8 g, 144 mmol) y acetato de sodio (13,6 g, 165 mmol) se disolvieron en anhídrido acético (368 ml), se sellaron en un recipiente de reacción de vidrio y se calentaron a 120 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción enfriada (un jarabe negro) se vertió sobre agua (3 l), se agitó y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró con un embudo de vidrio sinterizado y el filtrado transparente se evaporó y se secó a alto vacío dando el compuesto del título como un sólido amarillo (7,00 g, 20 %). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,73 (s, 2H), 3,40 (d, 2H, $J = 7$ Hz), 2,28 (m, 1H), 2,06 (m, 2H), 1,75 (m, 3H), 1,42 (m, 2H), 1,03 (m, 2H).

Maleimidilmetil-4-*trans*-ciclohexanocarboxisuccinato (3): El producto de la etapa B anterior (10,0 g, 42,1 mmol) se disolvió en diclorometano (50 ml) en atmósfera de Ar, se trató con N-hidroxisuccinimida (7,27 g, 63,2 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDAC, 12,4 g, 64,5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La solución marrón resultante se diluyó con diclorometano, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró con un embudo de vidrio sinterizado, y el filtrado se concentró y se secó al vacío. A continuación, este producto se disolvió en acetato de etilo caliente, se trató con carbón activado (1,5 g), se filtró y el filtrado se enfrió. La filtración del producto cristalino, el lavado con acetato de etilo frío y el secado por succión dieron el compuesto del título como un sólido de color tostado (5,52 g, 39 %). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,72 (s, 2H), 3,42 (m, 2H), 2,85 (s, 4H), 2,56 (tt, 1H, $J = 12$ Hz, 4 Hz), 2,18 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,70 (m, 1H), 1,56 (m, 2H), 1,09 (m, 2H).

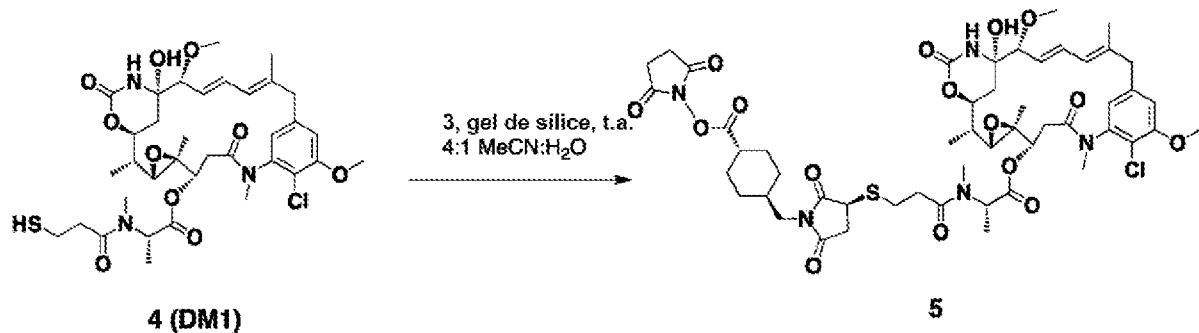


EJEMPLO 2

Maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamida-3-tiol (4): El compuesto del título, conocido en la técnica como DM1, se preparó utilizando una versión modificada del método descrito por Whitesides *et al.* (*J. Org. Chem.*, 1991, 56, 2648-2650). La maitansina-3-N-metil-L-Ala-(3-metildisulfanil)propanamida (**DM1-SMe**, 2,42 g, 3,09 mmol, preparad de manera similar a la de Ho y Carrozzella, solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0037972 A1) se disolvió en acetonitrilo (30 ml), se trató con una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (8,23 g, 28,7 mmol) en agua (30 ml), el pH se elevó a aproximadamente 3 con la adición de NaHCO_3 acuoso saturado (5 ml), se purgó el matraz con Ar y se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo un septo de goma (ventilado debido a la efervescencia). Al cabo de 2 h, la reacción se trató con salmuera (aproximadamente 100 ml), se burbujeó con Ar durante 5 minutos (para eliminar el metilmercaptano libre) y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo (EtOAc), se saturó con NaCl y se extrajo dos veces más con EtOAc. A continuación, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y el filtrado se concentró y se secó al vacío para dar el compuesto del título como un sólido blanco (2,24 g, 98 %). RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 6,76 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 6,63 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 6,59 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz), 6,35 (m, 2H), 5,59 (dd, 1H, $J = 15$ Hz, 9 Hz), 5,36 (c, 1H, $J = 6,5$ Hz), 4,68 (dd, 1H, $J = 12$ Hz, 3 Hz), 4,21 (t, 1H, $J = 10$ Hz), 3,92 (s, 3H), 3,60 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 3,42 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 3,29 (s, 3H), 3,14 (s, 3H), 3,05 (d, 1H, $J = 13$ Hz), 2,95 (d, 1H, $J = 10$ Hz), 2,77 (s, 3H), 2,75 - 2,47 (m, 6H), 2,11 (dd, 1H, $J = 14$ Hz, 3 Hz), 1,58 (s, 3H), 1,47 (d, 1H, $J = 14$ Hz), 1,40 (m, 1H), 1,22 (m, 6H), 0,73 (s, 3H). EM (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{ClN}_3\text{O}_{10}\text{S}$, 737,3; encontrado 738,3 (M+H), 720,3 (M-H $_2\text{O}$ +H).

Maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-*trans*-carboxisuccinato (5): El siguiente procedimiento describe un nuevo método no conocido en la técnica. El producto de la etapa anterior (**4**, 2,23 g, 3,02 mmol) y maleimidilmetil-4-ciclohexanocarboxisuccinato (**3**, 1,50 g, 4,49 mmol) se disolvieron en acetonitrilo/agua 4:1 (75 ml), se trataron con gel de sílice fino raspado de una placa de TLC preparativa (11,2 g), el matraz se purgó con Ar y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo un septo de goma. Al cabo de 18 horas, se añadieron más **3** (0,77 g, 2,3 mmol) y acetonitrilo (MeCN, 10 ml) y la reacción se agitó durante 6 horas más. La mezcla se filtró sobre celite, los sólidos se lavaron con MeCN y acetato de etilo (EtOAc) y el filtrado se concentró al vacío hasta obtener un sólido dorado, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida en un cartucho de gel de sílice de 120 g (50 - 100 % EtOAc/MeCN 1:1 en diclorometano durante 33 min, 75 ml/min). La evaporación y el

secado de las fracciones puras de la columna al vacío dieron el compuesto del título como un sólido de color crema (2,09 g). La concentración de las fracciones impuras y la repurificación en un cartucho de gel de sílice de 80 g tal como se indica anteriormente proporcionó un lote adicional de sólido de color crema (0,22 g) y llevó el rendimiento total del compuesto del título a 2,31 g (71 %). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,85 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 6,72 (m, 1H), 6,65 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 6,44 (dd, 1H, $J = 15$ Hz, 11 Hz), 6,25 (s, 1H), 5,67 (dd, 1H, $J = 16$ Hz, 9 Hz), 5,41 (m, 1H), 4,79 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 4,30 (t, 1H, $J = 11$ Hz), 3,72 (m, 2H), 3,51 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 3,37 (m, 4H), 3,27 (m, 1H), 3,23 (s, 3H), 3,16 - 2,99 (m, 4H), 2,85 (m, 7H), 2,62 (m, 3H), 2,39 (ddd, 1H, $J = 19$ Hz, 12 Hz, 4 Hz), 2,18 (br m, 2H), 1,77 (br m, 3H), 1,66 (s, 3H), 1,60 - 1,47 (m, 4H), 1,31 (m, 6H), 1,05 (m, 2H), 0,82 (s, 3H). EM (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{ClN}_5\text{O}_{16}\text{S}$, 1071,4; encontrado 1072,4 (M+H), 1054,9 (M-H₂O+H); $[\alpha]_{589}^{20} = -52,4$ ($c = 0,00301$, MeOH). Véase la figura 1 para el RMN de ^1H de un diastereómero único.

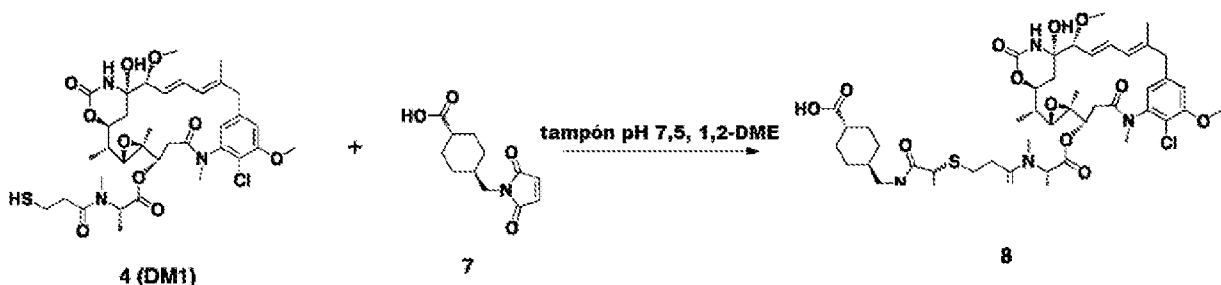


EJEMPLO 3

Mezcla de diastereoisómeros de *maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxisuccinato* (**6**): Una muestra de los estereoisómeros mezclados de **5** se sintetizó de acuerdo con la solicitud de patente de Estados Unidos 20100129314, ejemplo XI. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,85-6,6 (m), 6,4 (m), 6,1 (m), 5,8-5,4 (m), 5,2 (m), 4,92-4,79 (m), 4,4-4,1 (m), 4,03 (s), 3,82 (m), 3,8-2,2 (m), 2,1 (m), 2,07 (s), 2,0-0,8 (m). EM (ESI, pos.): calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{66}\text{ClN}_5\text{O}_{16}\text{S}$, 1071,4; encontrado 1072,4 (M+H). Véase la figura 2 para el RMN de ^1H de la mezcla de diastereómeros.

EJEMPLO 4

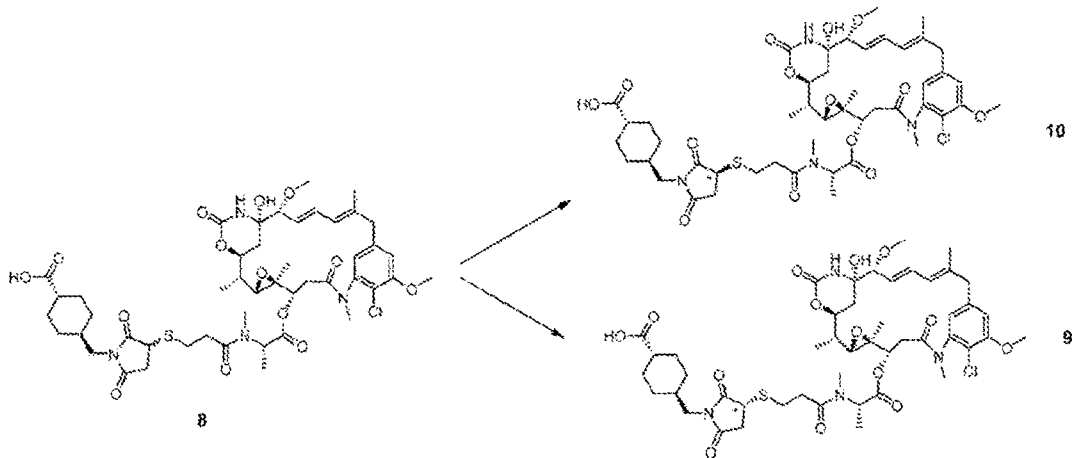
Ácido maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxílico (**8**): Una solución de ácido *trans*-1,4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico **7** (167 mg, 0,701 mmol) en 1,2-dimetoxietano (8 ml) se añadió a una solución de **4** (340 mg, 0,461 mmol) en 1,2-dimetoxietano (15 ml). A continuación, la mezcla se trató con tampón de pH 7,5 (20 ml) y unas gotas de NaHCO_3 acuoso saturado para mantener el pH. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón y después se concentró a presión reducida. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna de fase inversa usando una columna C18, columna de 20-40 micrómetros (100 g), eluyendo con un gradiente (10 95 % durante 25 min) de acetonitrilo (0,1 % AcOH) en agua (0,1 % AcOH), y se liofilizó para dar **8** (330 mg, 0,338 mmol, rendimiento del 73 %) como un sólido blanco. EM m/z : 977,2 [MH⁺], 957,2 [M-18], 999,2 [M+Na]; Pureza: > 98 % (por LC/MS).



EJEMPLO 5

Separación quiral de **8** para obtener los diastereómeros únicos (individuales) ácido (R^*)-*maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxílico* (**9**) y ácido (S^*)-*maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxílico* (**10**) (S^* y R^* representan un estereoisómero único de quiralidad desconocida): La mezcla diastereomérica de compuestos **8** (20 mg) se disolvió en 0,5 ml de acetonitrilo y se separó utilizando una columna quiral semipreparativa (Chiralcel OJ, sistema de disolventes,

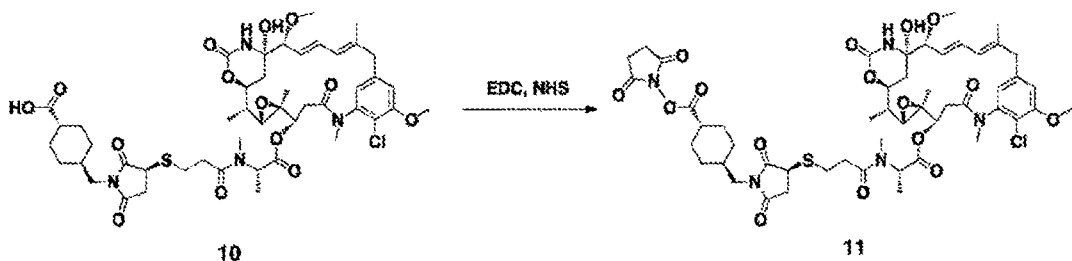
Hexanos:IPA:Etanol 6:1:1) para proporcionar 3,5 mg de **10** como el compuesto de elución más rápida, EM m/z : 977,2 [MH⁺], 957,2 [M-18], 999,2 [M+Na]; Pureza: > 95 % (por LC/MS), Rt = 32 min y 4,6 mg de **9** como el compuesto de elución más lenta, EM m/z : 977,2 [MH⁺], 957,2 [M-18], 999,2 [M+Na]; Pureza: > 95 % (por LC/MS), Rf = 48 min.



EJEMPLO 6

10 Síntesis de ácido (*S*^{*})-*maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxílico (11)*: Una solución de **10** (2,5 mg, 0,0026 mmol) se disolvió en diclorometano (1 ml) y luego se trató con N-hidroxisuccinimida (NHS, 6,0 mg, 0,052 mmol) y clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI, 13 mg, 0,065 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se lavó con agua y luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar el residuo bruto, que se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna C18, 20-40 micrómetros (30 g), eluyendo con un gradiente (10 - 95 % durante 18 min) de acetonitrilo (0,1 % AcOH) en agua (0,1 % AcOH), y se liofilizó para proporcionar **11**. EM m/z : 1073,2 [MH⁺], 1054,4 [M-18]; Pureza: 95 % (por LC/MS).

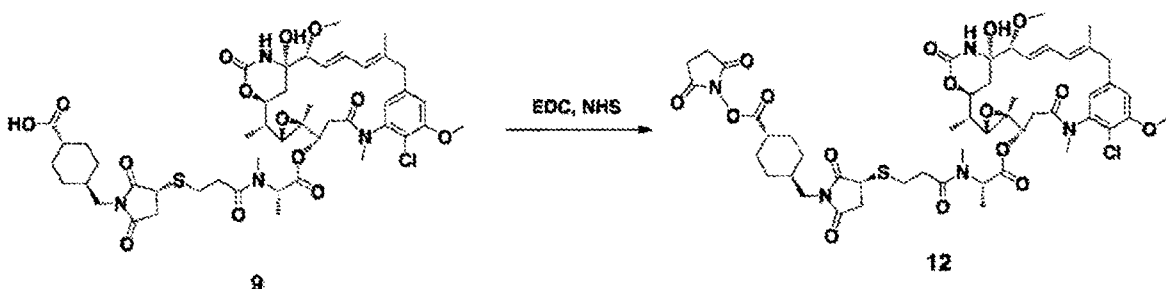
15



EJEMPLO 7

25 Ácido (*R*^{*})-*maitansina-3-N-metil-L-alanina-propanamidil-3-tio-3-succinimidil-N-metilciclohexil-4-trans-carboxílico (12)*: Una solución de **9** (3 mg, 0,003 mmol) se disolvió en diclorometano (1 ml) y luego se trató con N-hidroxisuccinimida (NHS, 3,0 mg, 0,026 mmol) y clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDCI, 7 mg, 0,036 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se lavó con agua y luego con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. El disolvente se evaporó a presión reducida para dar el residuo bruto, que se purificó mediante cromatografía de fase inversa utilizando una columna C18, 20-40 micrómetros (15 g), eluyendo con un gradiente (10-95 % durante 18 min) de acetonitrilo (0,1 % AcOH) en agua (0,1 % AcOH), y se liofilizó para proporcionar **12**. EM m/z : 1073,2 [MH⁺], 1054,4 [M-18]; Pureza: 95 % (por LC/MS).

30



EJEMPLO 8

Preparación y caracterización de conjugados.

5 Dos composiciones diferentes de maitansina-conector preparadas de acuerdo con los ejemplos anteriores (compuesto **5** y compuesto **6**) se conjugaron con varios anticuerpos monoclonales antígenos antitumorales. El compuesto **5** comprende predominantemente un diastereómero único de conector-compuesto citotóxico DM1, mientras que el compuesto **6** comprende una mezcla de varios diastereómeros de conector-DM1. Los anticuerpos utilizados en este ejemplo fueron un anticuerpo anti-HER2 que tiene regiones variables derivadas de humAb4D5-8 de Carter *et al.*, PNAS
10 1992 89 4285, un anticuerpo anti-EGFRvIII que tiene regiones variables derivadas del clon 131 del documento WO2013075048 A1, y un anticuerpo anti-MUC16 que tiene regiones variables derivadas del clon 3A5 del documento WO2007001851.

15 Los anticuerpos se expresaron en células CHO y se purificaron con proteína A. En este ejemplo también se utilizó un anticuerpo de control de isotipo no de unión derivado de un antígeno de enfermedad infecciosa sin relación con la oncología.

20 Los anticuerpos (10 mg/ml) en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 y 10 % (v/v) de DMA se conjugaron con un exceso de 6 veces el compuesto **5** o **6** durante 1 hora a temperatura ambiente. Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se filtraron en condiciones estériles. Las concentraciones de proteína y carga activa del conector se determinaron mediante análisis espectral UV y espectrometría de masas MALDI-TOF. La HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados utilizados eran > 95 % monoméricos, y la RP-HPLC estableció que había < 0,5 % de carga activa de conector no conjugado. Los rendimientos se notifican en la tabla 1 basándose en la proteína. Todos los anticuerpos conjugados se analizaron mediante UV para determinar los valores de carga activa del conector según Hamblett *et al.*, *Cancer Res* 2004 10 7063 y por diferencia de masa, nativos frente
25 a conjugados. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	
5	26790	5700	
6*	26790	5700	
Anticuerpo	$\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$	
HER2	81847	215388	
EGFRvIII	79579	209420	
MUC16	88671	248380	
Control de isotipo	81718	233480	
Conjugado de anticuerpo	Carga activa:Anticuerpo (UV)	Carga activa:Anticuerpo (MS)	% de rendimiento
HER2-5 (<i>in vivo</i>)	2,7	2,7	66
HER2-5 (<i>in vitro</i>)	3,1	2,4	75
HER2-6 (<i>in vitro</i>)	2,9	2,4	70
EGFRvIII-5	2,8	2,3	56
EGFRvIII-6	2,9	2,2	56
MUC16-5	2,4	2,0	76
MUC16-6	2,3	2,1	96
Control de isotipo-5	3,3	3,3	67

* Se utilizaron coeficientes de extinción del compuesto 5

30 EJEMPLO 9

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

35 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con PDL a una densidad de 10.000 (SK-BR-3 y NCI-N87), 15.000 (BT-474), 3000 (Ovcar-3 y PC3/Muc16), 2000 (HEK293/hEGFRvIII), 1500 (U251/hEGFRvIII) o 400

(MMT/hEGFRvIII) células por pocillo en medio de crecimiento completo y se cultivaron durante la noche. Para las curvas de viabilidad celular, a las células se añadieron conjugados anticuerpo-fármaco diluidos en serie o carga activa libre en concentraciones finales que variaban entre 1 μM y 1 pM y se incubaron durante 3 días. Cada concentración se analizó por duplicado y se notificó con la desviación típica respectiva. Las células se incubaron con CCK8 (Dojindo) durante las últimas 1-3 h y se determinó la absorbancia a 450 nm (OD_{450}) en un dispositivo Flexstation3 (Molecular Devices). Los niveles de OD_{450} de fondo de las células tratadas con digitonina (40 nM) se restaron de todos los pocillos y la viabilidad se expresa como un porcentaje de los controles no tratados. Los valores de CI_{50} se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos utilizando GraphPad Prism. Todas las curvas y los valores de CI_{50} se corrigen para los equivalentes de carga activa basados en la carga del experimento MALDI-TOF.

En las células SKBR3 (estirpe celular de cáncer de mama), que expresan HER2 de forma nativa 607 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (lotes *in vitro* e *in vivo*) tenía un valor de CI_{50} de 0,3 nM frente a 0,9 nM para la conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros HER2-6 (tabla 2, figura 3). Un pequeño lote *in vitro* se conjugó primero y solo se utilizó para ensayos de proliferación celular, mientras que un lote *in vivo* más grande se conjugó después y se utilizó para experimentos *in vitro* e *in vivo*. El anticuerpo HER2 desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células BT474 (estirpe celular de cáncer de mama), que expresan HER2 de forma nativa 426 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (*in vitro*) tenía un valor de CI_{50} de 4,6 nM mientras que el lote de HER2-5 (*in vivo*) tenía un valor de CI_{50} de 4,0 nM frente a 11,6 nM para el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros HER2-6 (tabla 2, figura 4). El anticuerpo HER2 desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células NCI-N87 (estirpe celular de cáncer de mama), que expresan HER2 de forma nativa 869 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único HER2-5 (*in vitro*) tenía un valor de CI_{50} de 0,6 nM mientras que el lote de HER2-5 (*in vivo*) tenía un valor de CI_{50} de 0,4 nM frente a 1,0 nM para el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros HER2-6 (tabla 2, figura 5). El anticuerpo HER2 desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células HEK293/hEGFRvIII, que expresan hEGFRvIII 360 veces por encima de la unión del control del isotipo, ambos conjugados (diastereómero único y mezcla de diastereómeros) exhibieron valores de CI_{50} de 0,4 nM (tabla 3, figura 6). El anticuerpo EGFRvIII desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células MMT/hEGFRvIII, que expresan hEGFRvIII 280 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único EGFRvIII-5 tenía un valor de CI_{50} de 0,5 nM mientras que el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros EGFRvIII-6 tenía un valor de CI_{50} de 9,8 nM (tabla 2, figura 7). El anticuerpo EGFRvIII desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células U251/hEGFRvIII, que expresan hEGFRvIII 165 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único EGFRvIII-5 tenía un valor de CI_{50} de 2,4 nM mientras que el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros EGFRvIII-6 tenía un valor de CI_{50} de 3,3 nM (tabla 3, figura 7). El anticuerpo EGFRvIII desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células Ovar-3 (estirpe celular de cáncer de ovario), que expresan MUC16 de forma nativa 373 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único MUC16-5 tenía un valor de CI_{50} de 6,3 nM mientras que el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros MUC16-6 tenía un valor de CI_{50} de 16,0 nM (tabla 4, figura 8). El anticuerpo Muc16 desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las células PC3/MUC16, que expresan MUC16 105 veces por encima de la unión del control del isotipo, el conjugado del compuesto diastereómero único MUC16-5 tenía un valor de CI_{50} de 0,34 nM mientras que el conjugado de la mezcla de compuestos diastereoisómeros MUC16-6 tenía un valor de CI_{50} de 0,8 nM (tabla 4, figura 9). El anticuerpo Muc16 desnudo tenía poca actividad antiproliferación.

En las figuras 3, 4 y 5, la maitansina-3-N-metil-L-Ala-(3-metildisulfanil) propanamida (DM1-SMe, preparada según Ho y Carrozzella, solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0037972 A1) se seleccionó para representar la carga activa en estos ensayos. El compuesto 4 sería demasiado reactivo para usarlo *in vitro* o *in vivo*, dando lugar así a resultados poco fiables.

Los resultados *in vitro* se resumen en las tablas 2-4 basados en las dianas a continuación. Este ejemplo demuestra que los conjugados de anticuerpo antitumoral-fármaco que comprenden el fármaco diastereómero único de la presente invención, en la mayoría de los casos, exhibían una mayor potencia de destrucción *in vitro* que los correspondientes conjugados anticuerpo-fármaco que comprenden una mezcla de diastereómeros. Para las dianas analizadas, los conjugados anticuerpo-fármaco del diastereómero único fueron normalmente del orden de 2 a 3 veces más potentes que los conjugados de las mezclas correspondientes, dependiendo de las estirpes celulares particulares ensayadas.

Tabla 2

Conjugado de anticuerpo	CI50 en SKBR3 (nM)	CI50 en BT474 (nM)	CI50 en N87 (nM)
HER2-5 (<i>in vivo</i>)	0,3	4,0	0,4
HER2-5 (<i>in vitro</i>)	0,3	4,6	0,6
HER2-6 (<i>in vitro</i>)	0,9	11,6	1,0

Tabla 3

Conjugado de anticuerpo	CI50 en HEK293/hEGFRvIII (nM)	CI50 en MMT/hEGFRvIII (nM)	CI50 en U251/hEGFRvIII (nM)
EGFRvIII-5	0,4	0,5	2,4
EGFRvIII-6	0,5	9,8	3,3

5

Tabla 4

Conjugado de anticuerpo	CI50 en Ovar-3 (nM)	CI50 en PC3/MUC16 (nM)
MUC16-5	6,3	0,34
MUC16-6	16,0	0,80

EJEMPLO 10

Estudios *in vivo*.

10

Para determinar la eficacia *in vivo* del conjugado del diastereómero único anti-HER2 ("HER2-5"), se realizaron estudios en ratones portadores de xenoinjertos de cáncer gástrico HER2+, ya que se había notificado previamente la eficacia en este modelo por Barok *et al.* (Barok M *et al.*, *Can. Letters* 2011). Específicamente, 5×10^6 células NCI-N87 (ATCC CRL-5822) se implantaron subcutáneamente en el flanco inferior derecho de ratones SCID CB-17 (Taconic). Una vez que los tumores hubieron alcanzado un volumen medio de 150 mm^3 , los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de ocho y se les administró una dosis de HER2-5 o reactivos de control. Los reactivos de control incluyeron vehículo PBS, DM1-SMe libre, control de isotipo, control de isotipo-5, o HER2. Los ratones recibieron las dosis una vez a la semana durante tres semanas y se controlaron los volúmenes de los tumores y los pesos corporales dos veces a la semana durante todo el estudio. Los conjugados se dosificaron a 1, 5 y 15 mg/kg, ya que estas dosis habían demostrado su eficacia en los estudios *in vivo* previos de Lewis-Phillips *et al.* (Lewis-Phillips G *et al.*, *Can Res* 2008).

15

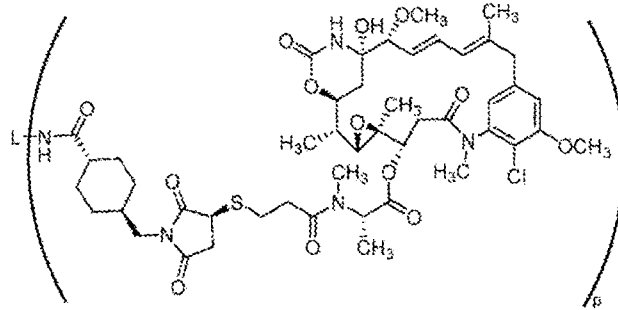
20

25

En el modelo de tumor N87 actual, el HER2-5 demostró una clara eficacia antitumoral, con dosis de 5 y 15 mg/kg que produjeron disminuciones significativas del volumen tumoral inicial y la erradicación de algunos tumores con la dosis más alta (figuras 11 y 12). También se observó un retraso significativo en el crecimiento del tumor en relación con los agentes de control en el nivel de dosis de 1 mg/kg. No se observaron acontecimientos adversos después de la dosificación, y los ratones que recibieron HER2-5 demostraron un fuerte aumento de peso a lo largo del estudio (figura 13).

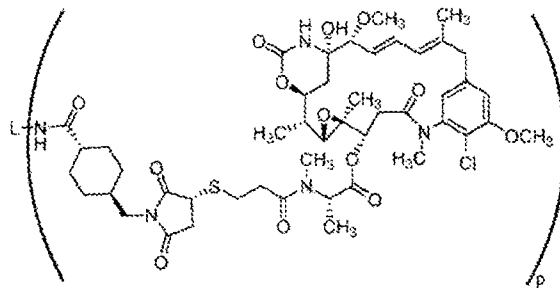
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de conjugados de ligando-fármaco de fórmulas IIa o IIb



IIa

5



IIb

en donde

10

L es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo;

p es un número entero de 1 a 10;

y en donde el compuesto de fórmulas IIa o IIb está presente en un exceso diastereomérico de más del 50 % con respecto a un diastereómero que tiene una configuración estereoquímica diferente en un carbono quiral, en donde el átomo de carbono quiral es el átomo de carbono que está unido al átomo de azufre en las fórmulas IIa o IIb.

15

2. La composición de la reivindicación 1, en donde L es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor y además en donde el antígeno asociado a un tumor se selecciona del grupo que consiste en AFP, ALK, proteínas BAGE, β-catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, proteínas MAGE, MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16 o CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR-α, PDGFR-β, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3.

20

25

3. La composición de la reivindicación 2, en donde el antígeno asociado a un tumor se selecciona entre el grupo que consiste en EGFRvIII, Her2, y Muc16, y/o el compuesto de fórmulas IIa o IIb están presentes en un exceso diastereomérico de más del 95 %.

30

4. La composición de la reivindicación 2, en donde las proteínas GAGE se seleccionan del grupo que consiste en GAGE-1 y GAGE-2 y/o las proteínas MAGE se seleccionan del grupo que consiste en MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-6 y MAGE-12.

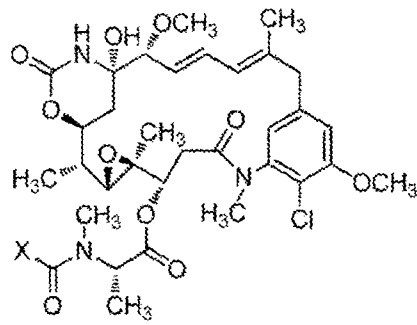
35

5. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el compuesto de fórmulas IIa o IIb está presente en un exceso diastereomérico de más del 95 %.

40

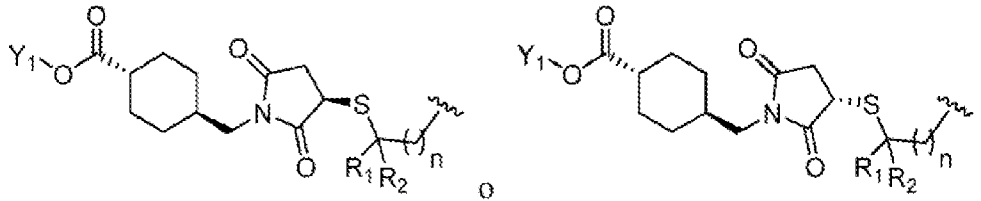
7. Una composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I



I

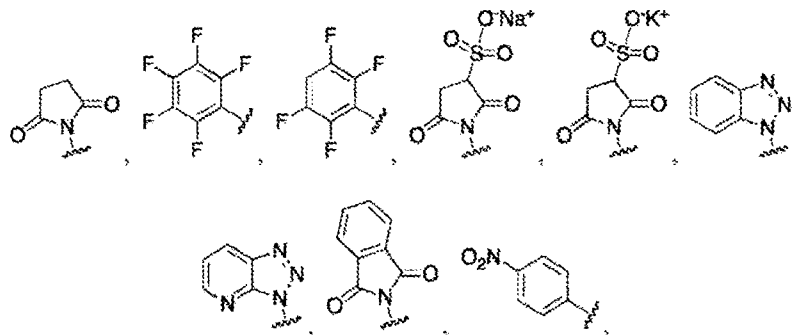
en donde

5 X es



Y₁ es

10



15 o hidrógeno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo; y

n es independientemente cero o un número entero de uno a cincuenta;

en donde la pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I comprenden una mezcla de dos diastereómeros, un primer diastereómero y un segundo diastereómero, en donde dichos primer diastereómero y segundo diastereómero son por lo demás idénticos, excepto por que dichos primer y segundo diastereómeros tienen una configuración estereoquímica diferente en un carbono quiral en donde el átomo de carbono quiral es el átomo de carbono que está unido al átomo de azufre en X;

20

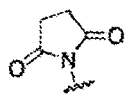
en donde el primer diastereómero o el segundo diastereómero están presentes en un exceso diastereomérico de más del 50 %; y

25

en donde el alquilo se selecciona entre metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo e isohexilo.

8. La composición de la reivindicación 7, en donde

30 Y₁ es

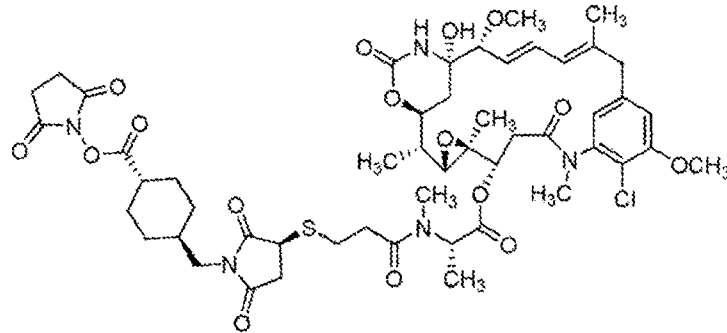


R₁ y R₂ son hidrógeno;

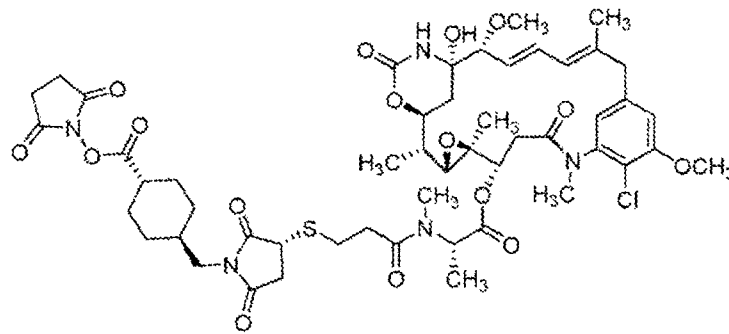
n es uno; y/o
el exceso diastereomérico es al menos del 95 %.

9. La composición de las reivindicaciones 7 u 8, en donde el compuesto de fórmula I es

5



o



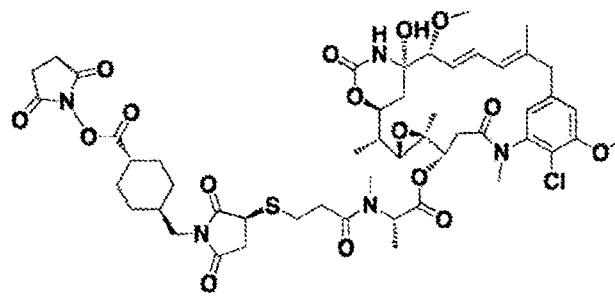
10

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el compuesto de fórmula I **se caracteriza por** un RMN de ^1H **caracterizado por** desplazamientos delta de (300 MHz, CDCl_3) δ 6,85 (d, 1H, J = 4 Hz), 6,72 (m, 1H), 6,65 (d, 1H, J = 4 Hz), 6,44 (dd, 1H, J = 15 Hz, 11 Hz), 6,25 (s, 1H), 5,67 (dd, 1H, J = 16 Hz, 9 Hz), 5,41 (m, 1H), 4,79 (d, 1H, J = 11 Hz), 4,30 (t, 1H, J = 11 Hz), 3,72 (m, 2H), 3,51 (d, 1H, J = 9 Hz), 3,37 (m, 4H), 3,27 (m, 1H), 3,23 (s, 3H), 3,16 - 2,99 (m, 4H), 2,85 (m, 7H), 2,62 (m, 3H), 2,39 (ddd, 1H, J = 19 Hz, 12 Hz, 4 Hz), 2,18 (br m, 2H), 1,77 (br m, 3H), 1,66 (s, 3H), 1,60 - 1,47 (m, 4H), 1,31 (m, 6H), 1,05 (m, 2H), 0,82 (s, 3H).

15

11. Un compuesto de fórmula (i)

20



(i)

en donde el compuesto es estereoméricamente puro.

12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, para su uso en terapia.

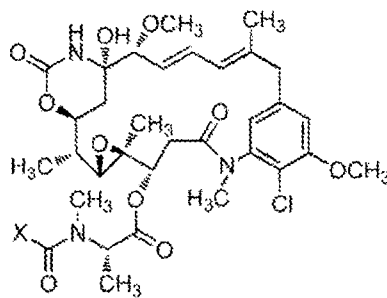
25

13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad sensible al tratamiento.

30

14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad se selecciona entre un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria y una enfermedad inflamatoria.

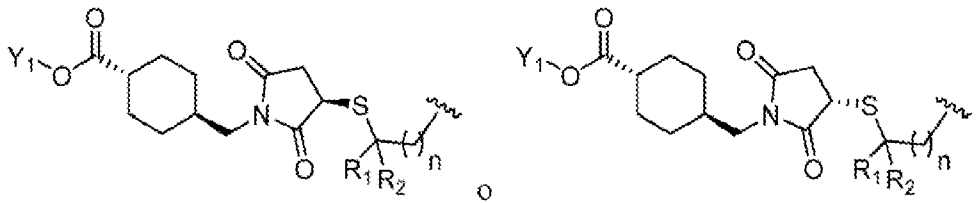
15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociados a un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor se selecciona del grupo que consiste en
- 5 AFP, ALK, proteínas BAGE, β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CD20, CD40, CDK4, CEA, CLEC12A, cMET, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, proteínas MAGE, MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16 o CA-125, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA, FOLH1, proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto presente en un exceso diastereomérico.
- 10
- 15 16. Un proceso para preparar una composición que comprende una pluralidad de moléculas de fármaco de fórmula I



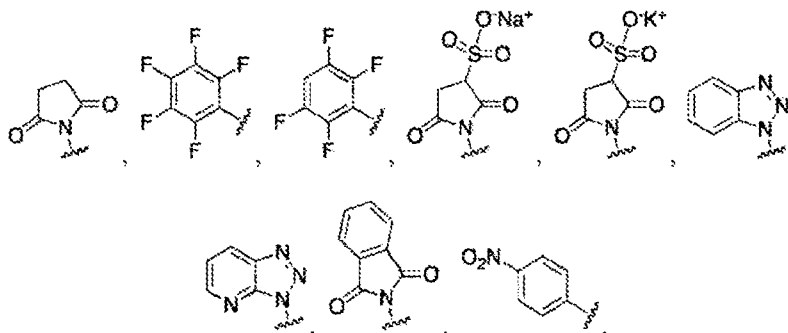
I

en donde

20 X es



25 Y₁ es

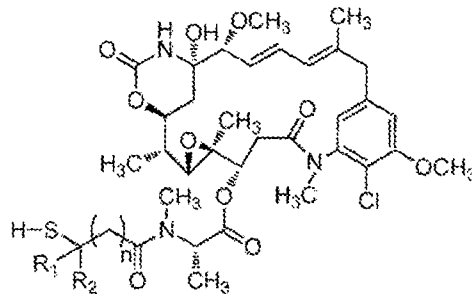


30 o hidrógeno;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente entre hidrógeno o alquilo; y n es independientemente cero o un número entero de uno a cincuenta; que comprende las etapas de

35 (a) poner en contacto

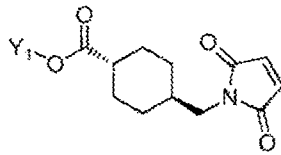
(i) un compuesto de fórmula III



III;

5

(ii) un compuesto de fórmula IV



IV

10

(iii) gel de sílice;
(iv) un disolvente orgánico; y
(v) agua; y

15

(b) aislar el compuesto de fórmula (I), en donde el compuesto de fórmula I está presente en un exceso diastereomérico de más del 50 % con respecto a un diastereómero que tiene una configuración estereoquímica diferente en un carbono quiral, en donde el átomo de carbono quiral es el átomo de carbono que está unido al átomo de azufre en X.

20

17. El proceso de la reivindicación 16, en donde

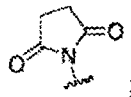
el disolvente orgánico comprende un disolvente aprótico polar, y el disolvente aprótico polar comprende preferentemente acetonitrilo;
el disolvente orgánico y el agua están presentes en una proporción en volumen de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 4:1 o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1;
la proporción molar del compuesto de fórmula III y el compuesto de fórmula IV es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:3; y/o
n es uno, y R₁ y R₂ son cada uno independientemente hidrógeno.

25

30

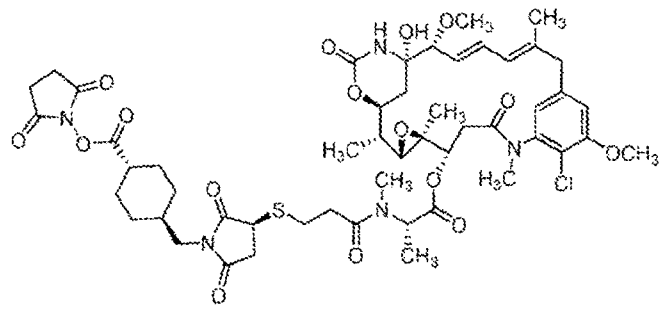
18. El proceso de la reivindicación 16 o 17, en donde

Y₁ es

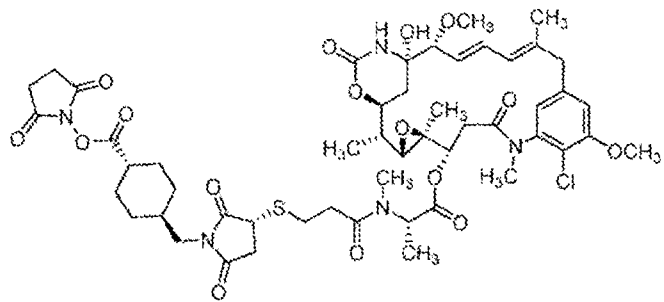


35

R₁ y R₂ son hidrógeno;
n es uno; y
el compuesto de fórmula I es



o



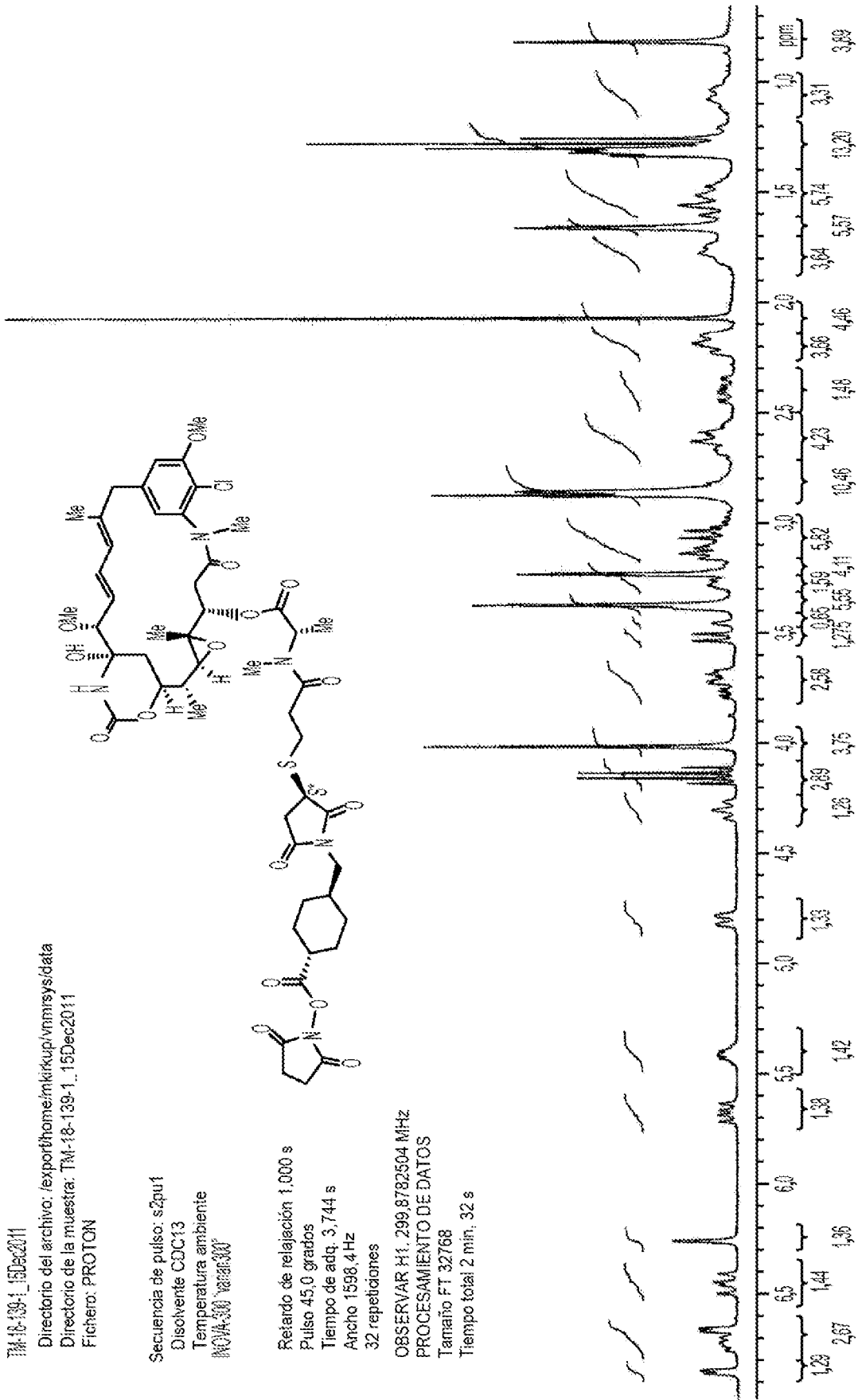


Figura 1

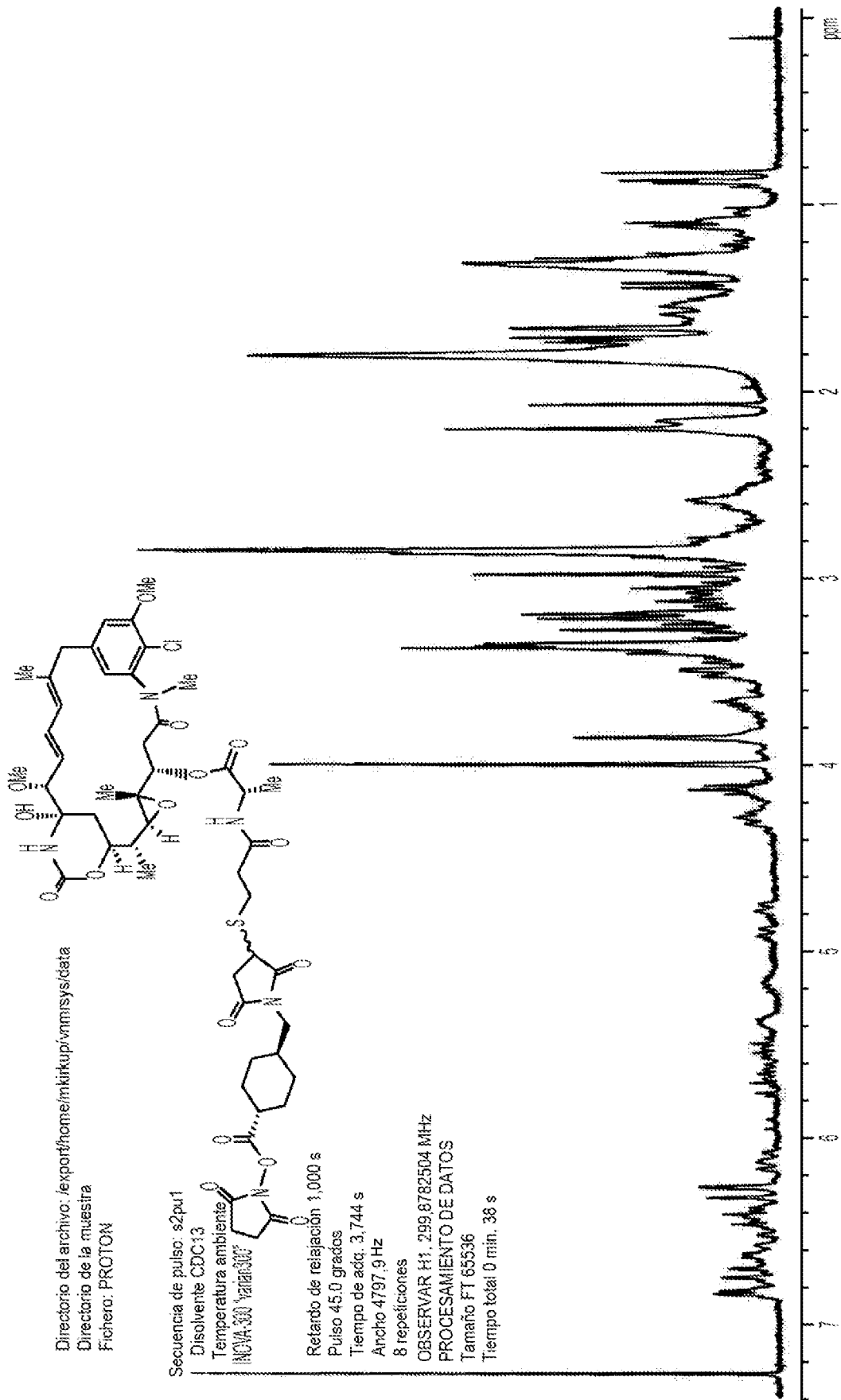


Figura 2

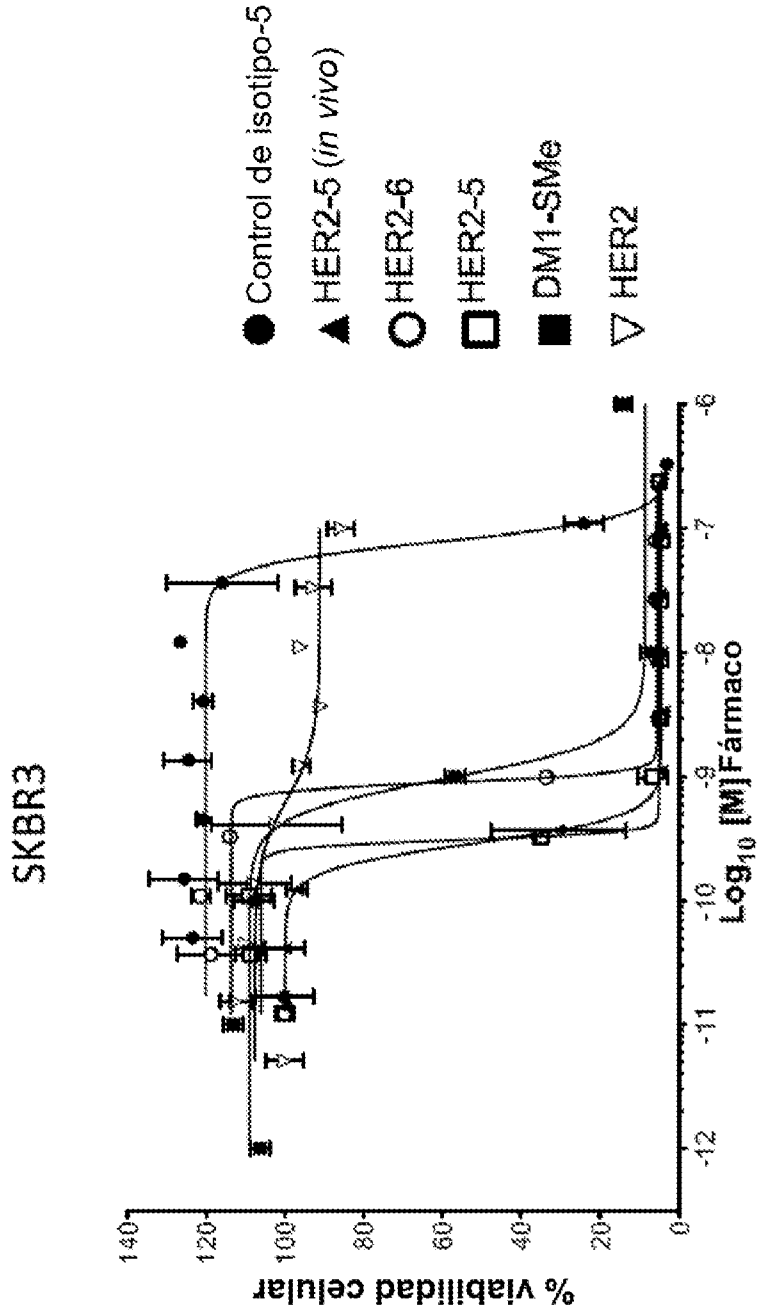


Figura 3

BT474

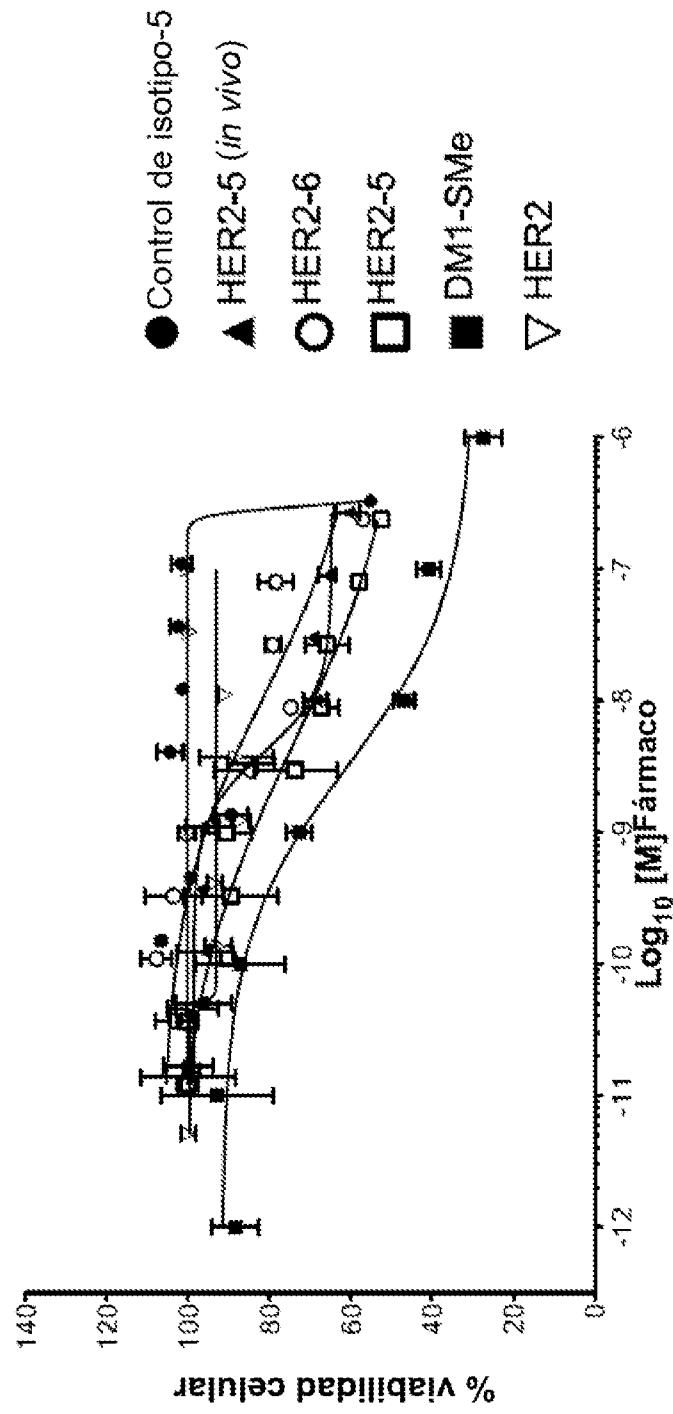


Figura 4

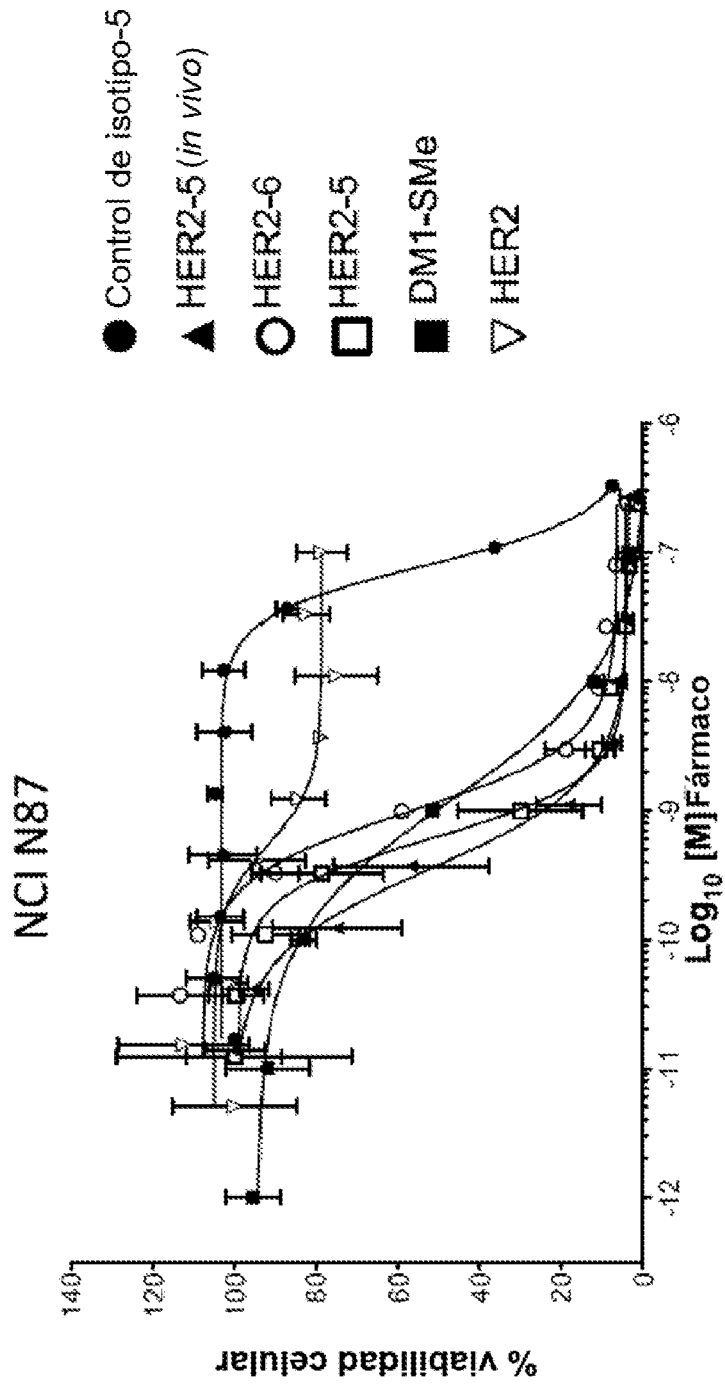


Figura 5

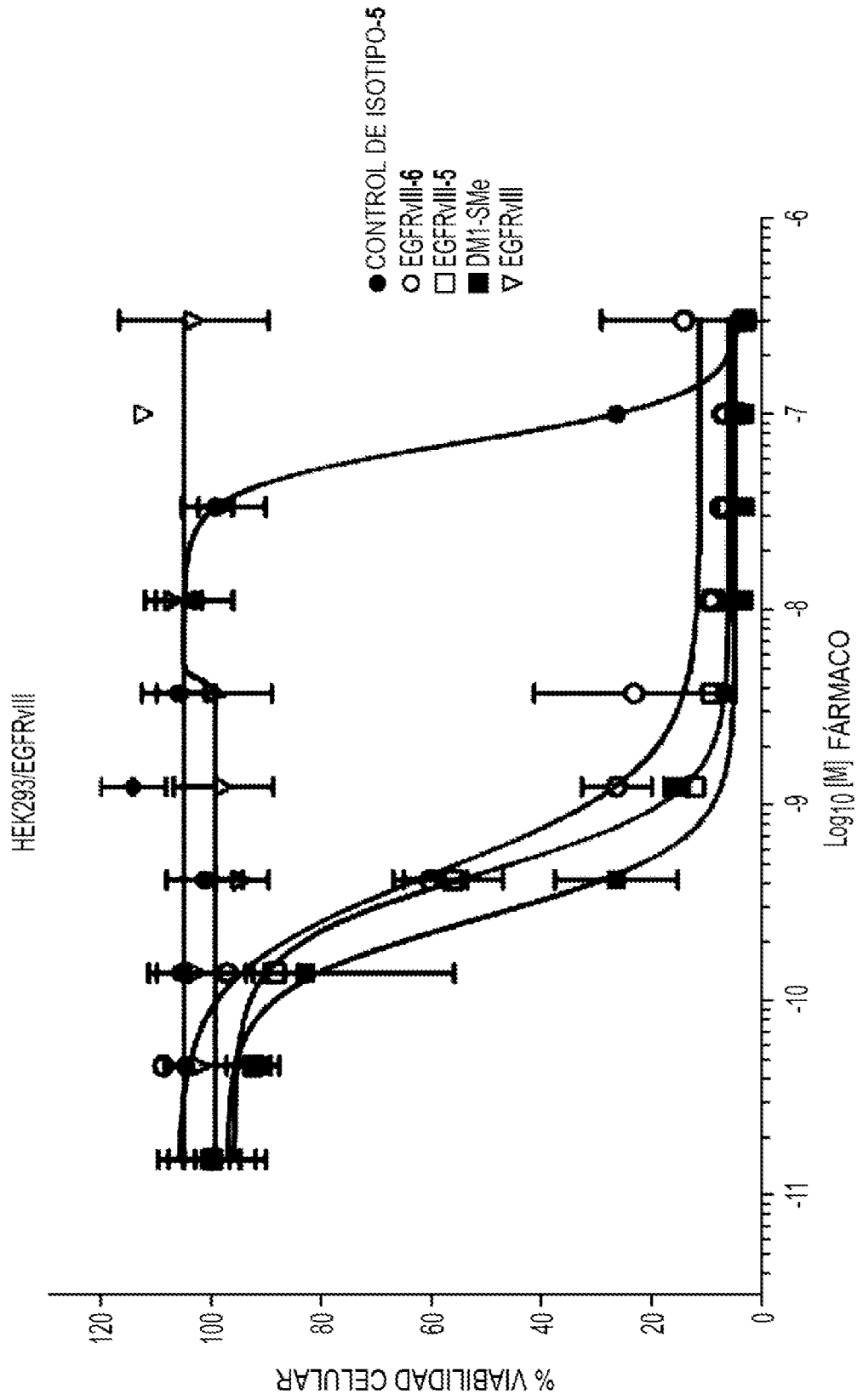


Figura 6

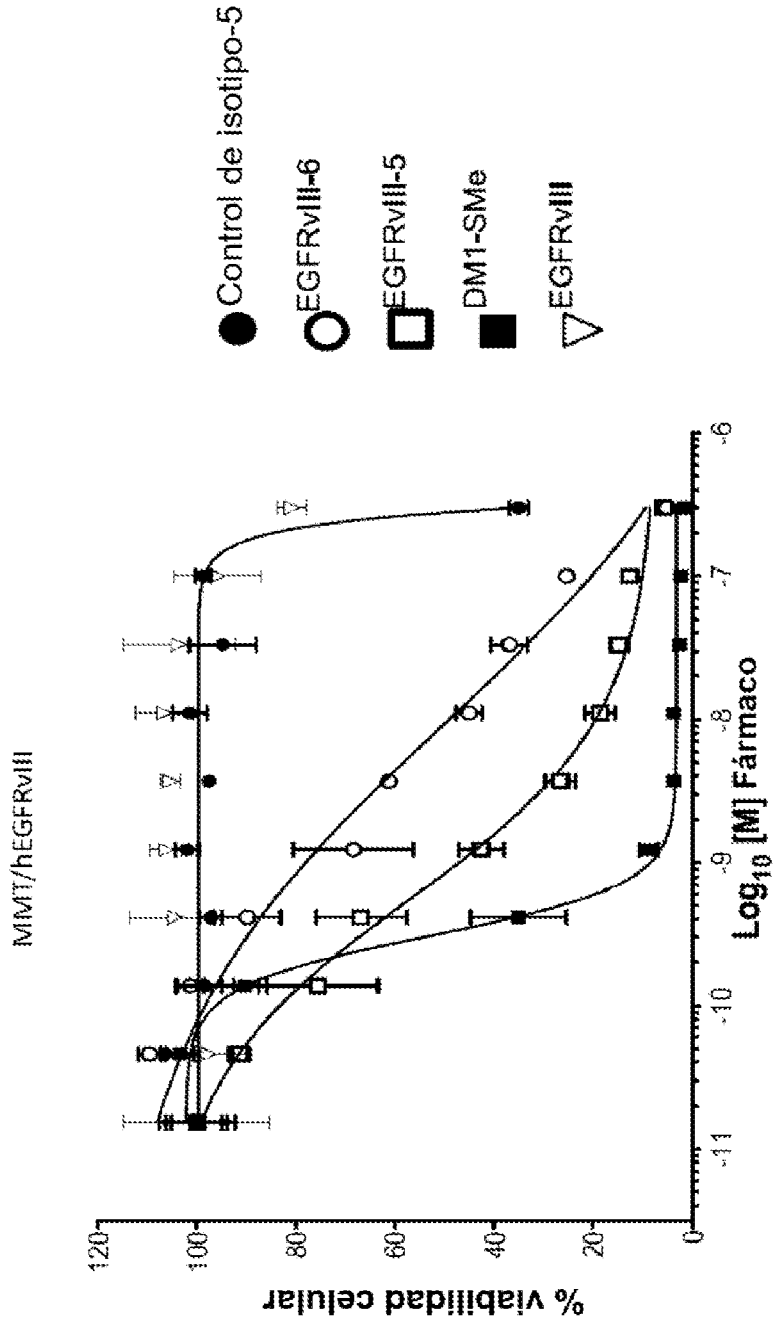


Figura 7

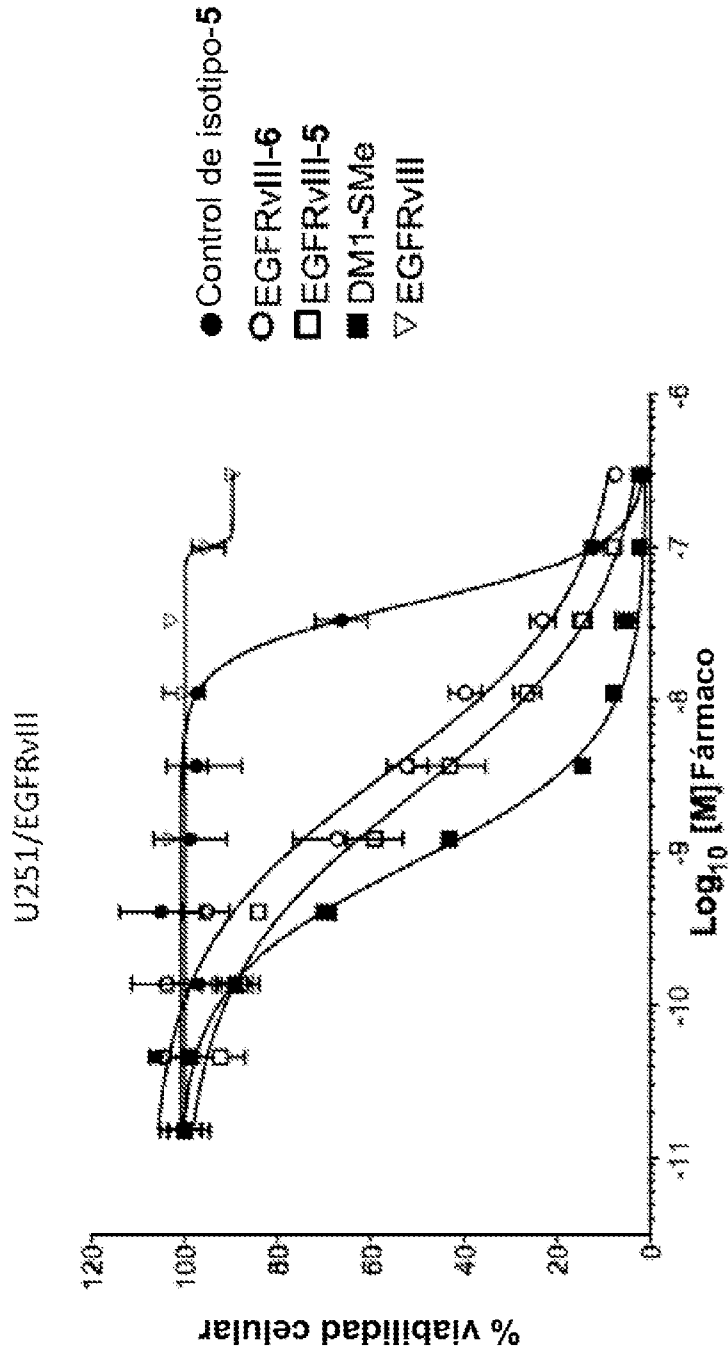


Figura 8

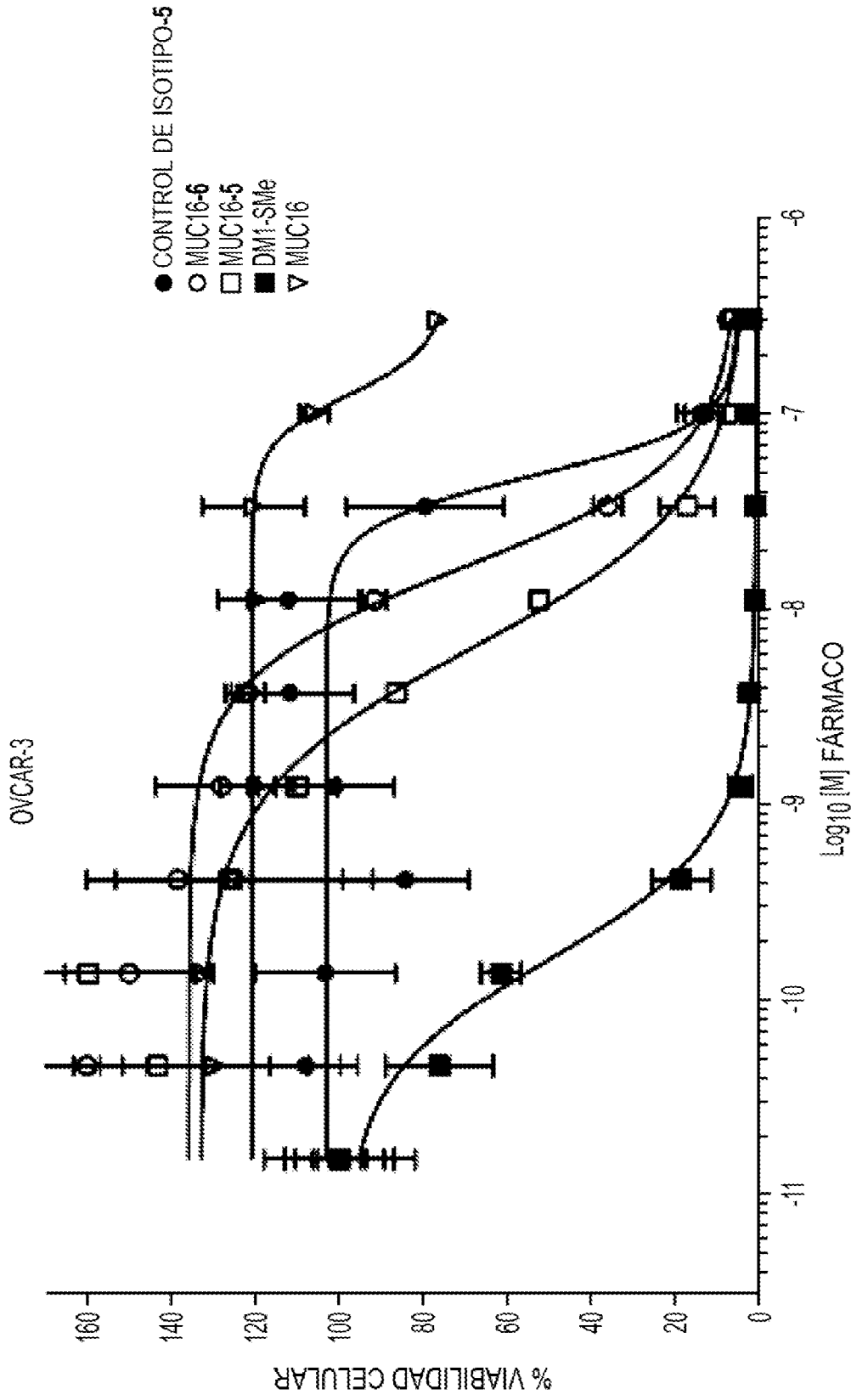


Figura 9

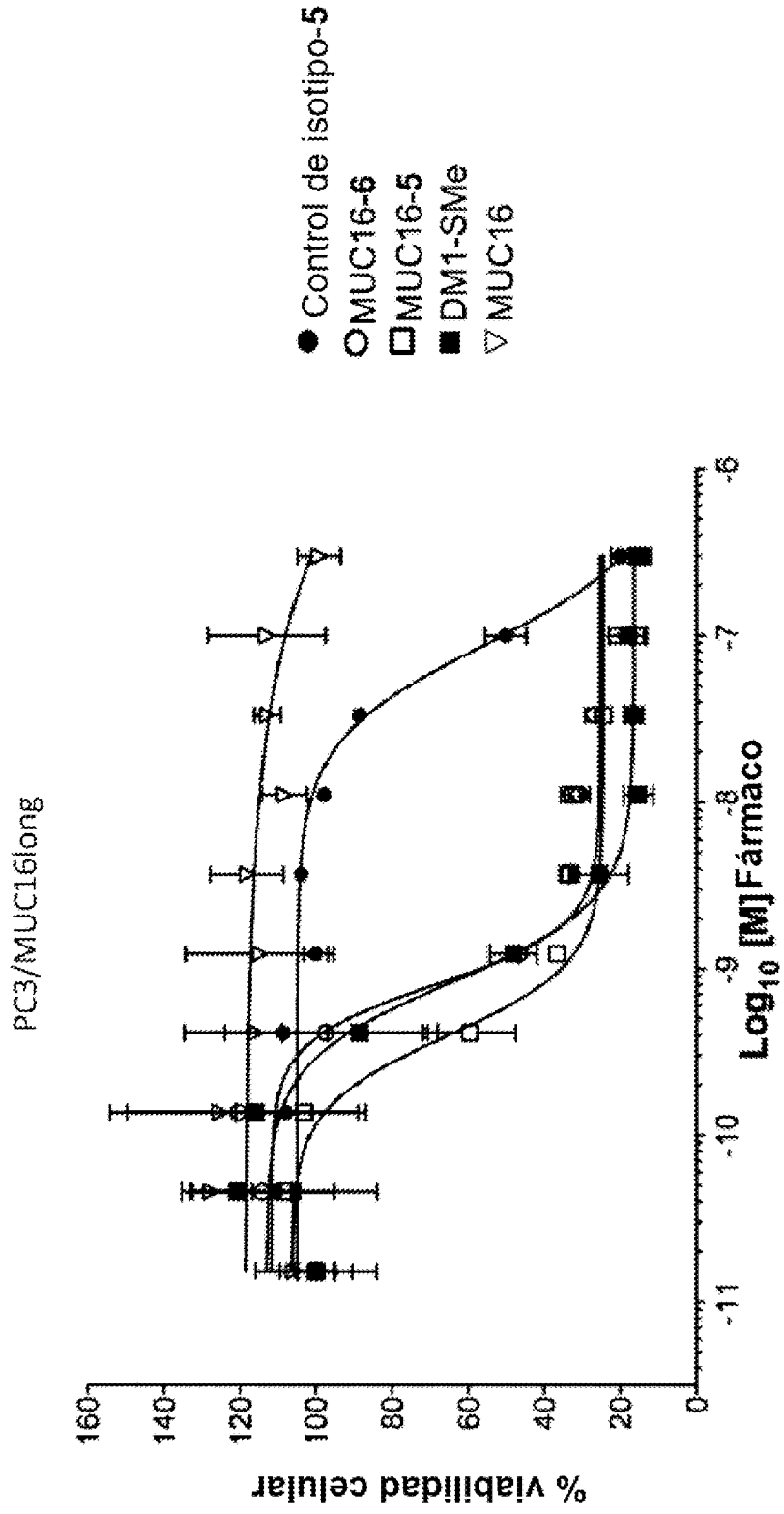


Figura 10

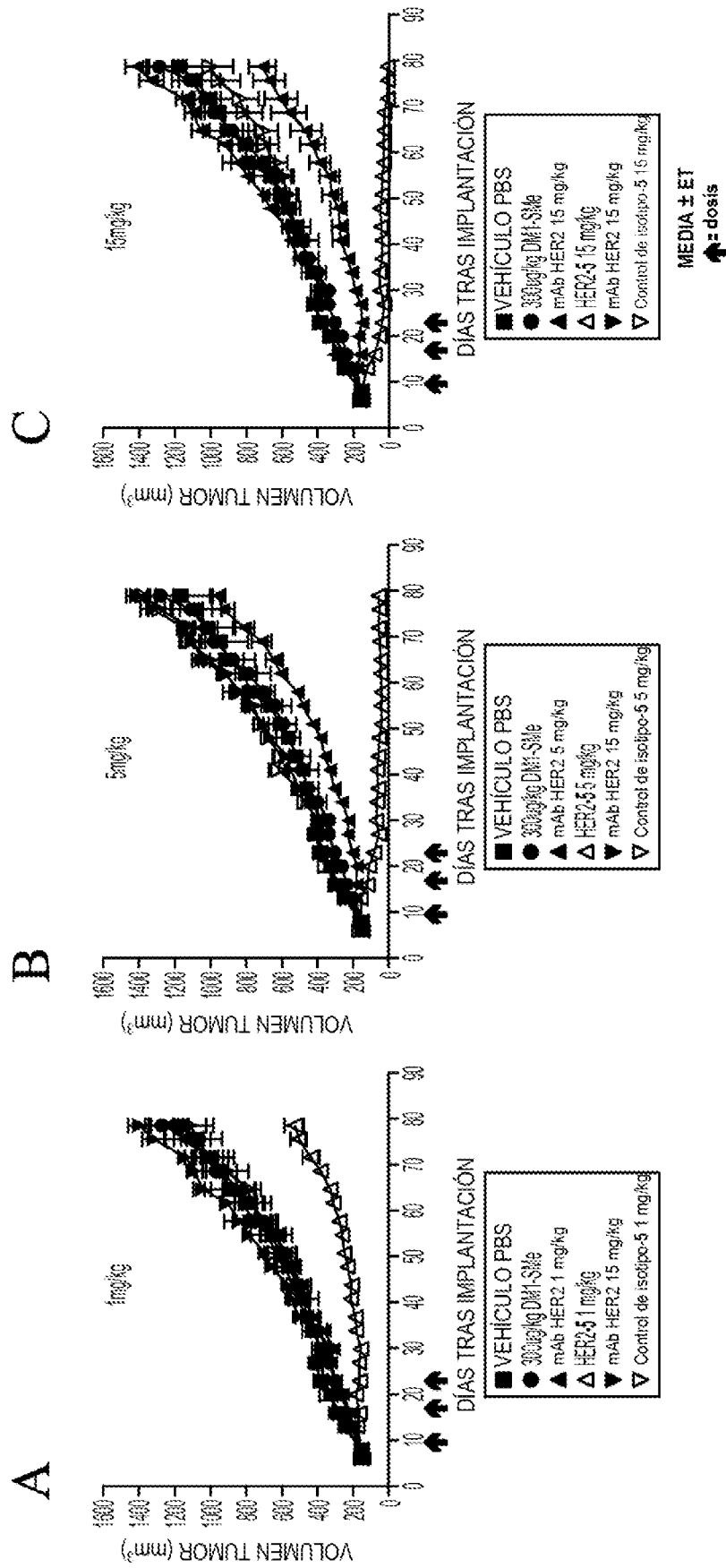
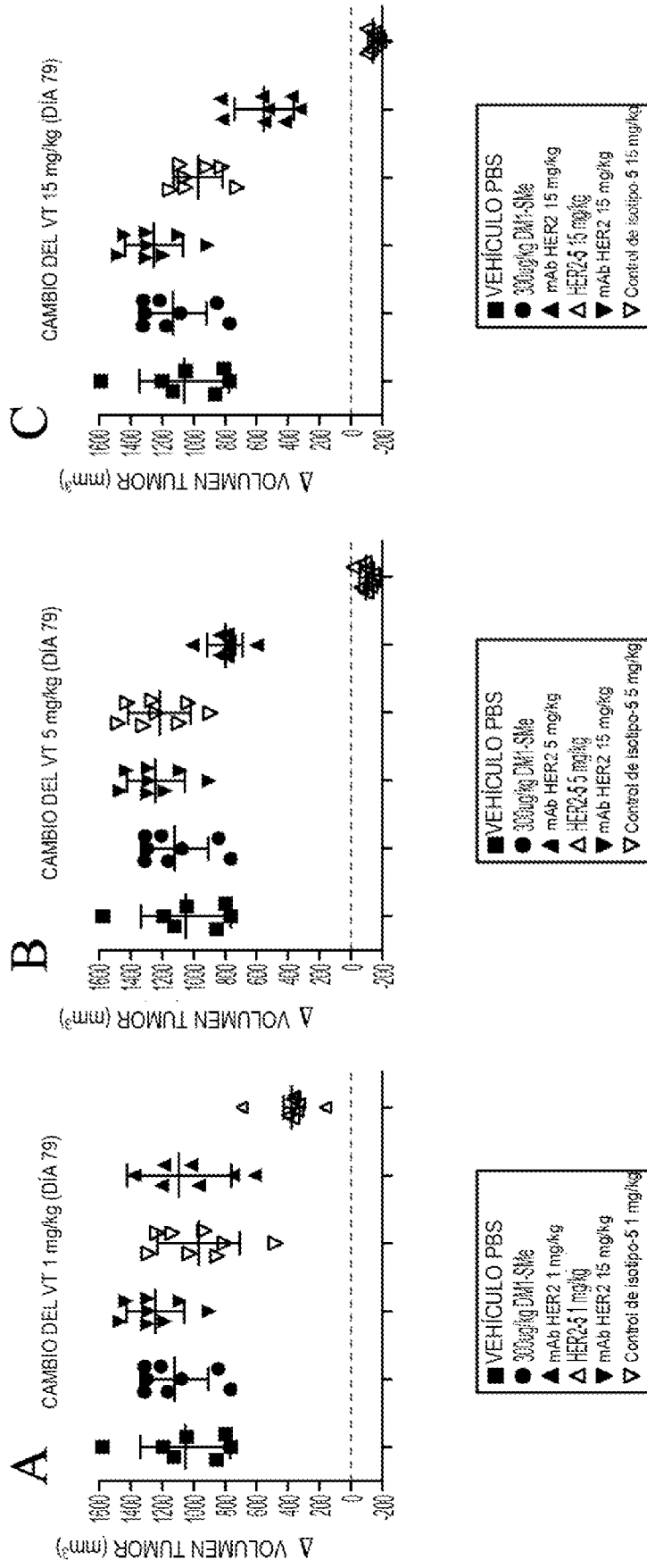


Figura 11



MEDIA ± DT

Figura 12

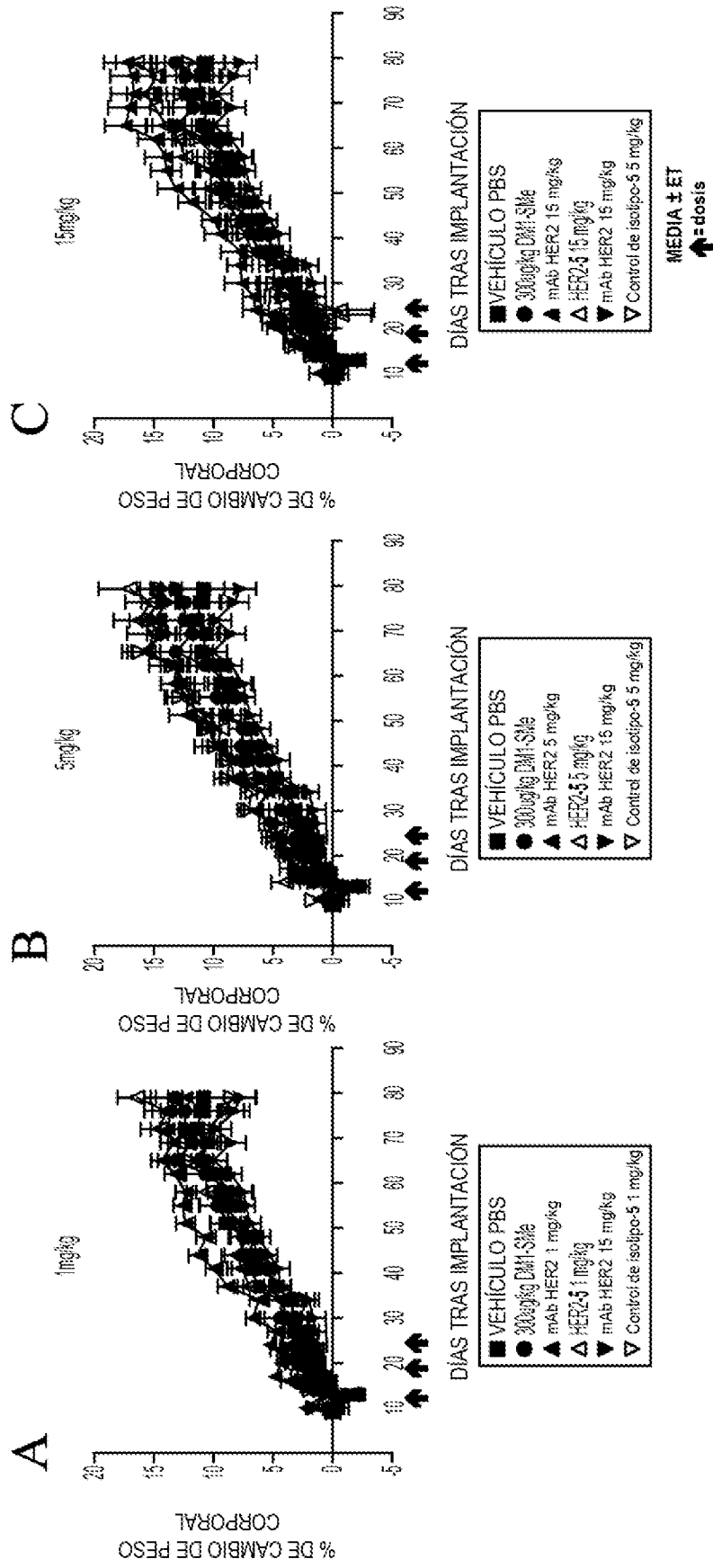


Figura 13