

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 473**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2020** **PCT/US2020/027831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2020** **WO20219287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2020** **E 20722197 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023** **EP 3958977**

54 Título: **Derivados de camptotecina**

30 Prioridad:

26.04.2019 US 201962839440 P

17.07.2019 US 201962875169 P

18.02.2020 US 202062978159 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2024

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451-1477, US

72 Inventor/es:

CHARI, RAVI;
WIDDISON, WAYNE, C.;
LI, WEI y
PLEYNET, DAVID, P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 966 473 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

Derivados de camptotecina

5 Campo de la solicitud

Se describen en el presente documento compuestos novedosos, y conjugados de los mismos. Más específicamente, esta descripción se refiere a nuevos derivados de camptotecina, compuestos intermedios, metabolitos y conjugados de los mismos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son útiles como medicamentos, en particular como agentes antiproliferativos (agentes anticancerosos).

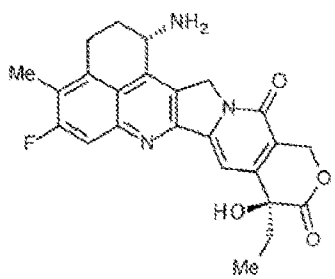
Antecedentes

15 Los conjugados de agente de unión a células-fármaco, incluidos los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), están emergiendo como una poderosa clase de agentes con eficacia en una variedad de crecimientos celulares anormales o enfermedades proliferativas (p. ej., cánceres). Los conjugados de agente de unión a células-fármaco (tales como los ADC) se componen comúnmente de tres elementos distintos: un agente de unión a células (p. ej., un anticuerpo); un enlazador; y un resto citotóxico.

20 La camptotecina (CPT) es un alcaloide pentacíclico aislado de la corteza y el tallo de *Camptotheca acuminata* (Camptotheca, árbol feliz), un árbol nativo de China. La camptotecina inhibe la topoisomerasa I, que conduce a la muerte celular. Debido a su mecanismo citotóxico y a su actividad antitumoral de amplio espectro, se han realizado esfuerzos sustanciales para desarrollar análogos clínicos de camptotecina. Sin embargo, la escasa solubilidad e inactividad en condiciones fisiológicas han limitado el desarrollo clínico de análogos de camptotecina adecuados. La camptotecina y la mayoría de sus derivados no son solubles en tampones acuosos. Además, la camptotecina está en equilibrio en una forma de lactona activa y una forma de carboxilato hidrolizado inactivo, limitando así su eficacia terapéutica.

30 Los conjugados de anticuerpo-fármaco se describen en el documento EP 3088419 y comprenden un compuesto antitumoral representado por la [Fórmula 1]:

[Fórmula 1]



35 que se conjuga con un anticuerpo anti-TROP2 mediante un enlace tioéter que se forma en un resto de enlace disulfuro presente en una parte de bisagra del anticuerpo anti-TROP2 a través de un enlazador específico. También se describe el uso de los conjugados como fármacos antitumorales.

40 Se describen conjugados en el documento US 2006/193865, y son de la fórmula: TM-[L]-CPT, donde TM es un resto dirigido a la enfermedad; CPT es camptotecina o un análogo de la misma; y L es el sistema enlazador del tipo X-Y-Z en donde X es un resto de acoplamiento de resto dirigido a la enfermedad, Y es un polipéptido escindible por lisosomas, y Z es el resto 4-aminobenciloxi, que está conectado al fármaco CPT. También se describen procedimientos para preparar los conjugados, y su uso como medicamentos.

45 Los glicoconjugados de derivados de camptotecina se describen en el documento DE 19640207, en el que al menos un componente de carbohidrato está unido por medio de espaciadores adecuados al anillo A o B de un derivado de camptotecina. También se describen procedimientos para preparar los compuestos, y su uso como medicamentos, en particular para uso en relación con cánceres.

50 Existe la necesidad de derivados de camptotecina terapéuticamente eficaces que tengan solubilidad, potencia, estabilidad de lactona y biodisponibilidad incrementadas.

Compendio

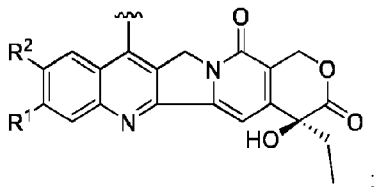
55 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la invención proporciona un compuesto

de Fórmula I, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

Z-L¹-D (Fórmula I)

5 en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:



10

R¹ es -F;

R² es metilo;

15 -L¹-Z es (i) -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂; o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶ o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶;

R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo; y

20

R⁶ es independientemente -H, metilo o bencilo;

con la condición de que -L¹-Z no puede ser -CH₂OH.

25 En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂.

30 En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(CH₂)₂OH, -(CH₂)₃OH, -(CH₂)₄OH, -CH₂OMe, -(CH₂)₂OMe, -(CH₂)₃OMe, -(CH₂)₄OMe, -CH₂SH, -(CH₂)₂SH, -(CH₂)₃SH, -(CH₂)₄SH, -CH₂SMe, -(CH₂)₂SMe, -(CH₂)₃SMe, -(CH₂)₄SMe, -CH₂NH₂, -(CH₂)₂NH₂, -(CH₂)₃NH₂ o -(CH₂)₄NH₂.

35 En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶ o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶.

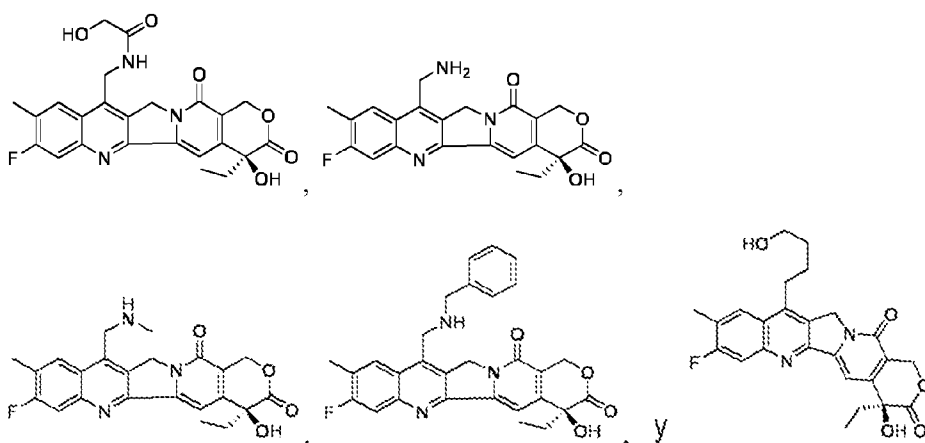
40 En algunas realizaciones, -L¹-Z es -CH₂NHC(=O)CH₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OH, -CH₂NHC(=O)CH₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OMe, -CH₂NHC(=O)CH₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SH, -CH₂NHC(=O)CH₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SMe, -CH₂SCH₂SH, -CH₂S(CH₂)₂SH, -CH₂S(CH₂)₃SH, -CH₂S(CH₂)₄SH, -CH₂S(CH₂)₅SH, -CH₂SCH₂SMe, -CH₂S(CH₂)₂SMe, -CH₂S(CH₂)₃SMe, -CH₂S(CH₂)₄SMe o -CH₂S(CH₂)₅SMe.

45 Cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁵ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es bencilo.

50 Cada R⁶ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁶ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁶ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁶ es bencilo.

55

En algunas realizaciones, el compuesto es uno cualquiera de los compuestos seleccionados de los siguientes:



5 En algunas realizaciones, el compuesto es uno cualquiera de los compuestos seleccionados de la Tabla 1B.

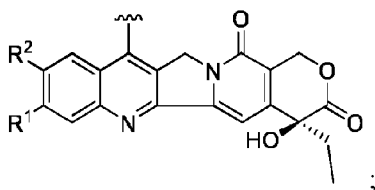
En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula II, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

10 E-A-Z'-L¹-D (Fórmula II)

en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:

15



R¹ es -F;

20 R² es metilo;

L¹-Z'-* es (i) -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸*, o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸*, donde * es el sitio unido covalentemente a A;

cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo; cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo;

30 A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

(i) -(alquilen C₁-C₆)-X⁵-Y³, en donde:

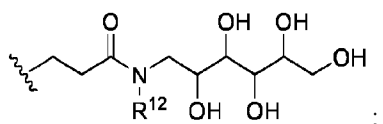
X⁵ es -NR¹²C(=O)- o -C(=O)NR¹²-;

35

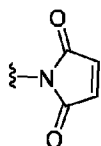
Y³ es -alquilo C₁-C₁₀, donde Y³ está sustituido con 0-10 grupos OH; y

R¹² es -H, alquilo C₁-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, heteroarilo o bencilo; o

40 (ii)



en donde R¹² es H o metilo; E es -C(=O)-(alquilen C₁-C₁₀)-X³; y X³ es



- 5 En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸.*

- 10 En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -CH₂O-CH₂NH*, -(CH₂)₂O-CH₂NH*, -(CH₂)₃O-CH₂NH*, -(CH₂)₄O-CH₂NH*, -CH₂S-CH₂NH*, -(CH₂)₂S-CH₂NH*, -(CH₂)₃S-CH₂NH*, -(CH₂)₄S-CH₂NH*, -CH₂NH*, -(CH₂)₂NH*, -(CH₂)₃NH*, o -(CH₂)₄NH*.

- 15 En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*. En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸.*

- 20 En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -CH₂NHC(=O)CH₂O-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂O-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃O-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄O-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅O-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)CH₂S-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂S-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃S-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄S-CH₂-NH*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅S-CH₂-NH*, -CH₂SCH₂O-CH₂-NH*, -CH₂SCH₂S-CH₂-NH*, -CH₂S(CH₂)₂S-CH₂-NH*, -CH₂S(CH₂)₃S-CH₂-NH*, -CH₂S(CH₂)₄S-CH₂-NH* o -CH₂S(CH₂)₅S-CH₂-NH*.

- 30 Cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁵ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es bencilo. Cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁸ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es bencilo.

- En las diversas realizaciones que describen -L¹-Z¹-* en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a A.

- 35 En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, cada aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido D.

- 40 En algunas realizaciones, A es -(AA¹)-(AA²)_{a1}*, donde * es el sitio unido covalentemente a E; AA¹ y AA² son cada uno independientemente un resto de aminoácido; y a1 es un número entero de 1 a 9.

- 45 En algunas realizaciones, -(AA¹)-(AA²)_{a1}* es -Gly-Gly-Gly*, -Ala-Val*, -Val-Ala*, -Val-Cit*, -Val-Lys*, -Lys-Val*, -Phe-Lys*, -Lys-Phe*, -Lys-Lys*, -Ala-Lys*, -Lys-Ala*, -Phe-Cit*, -Cit-Phe*, -Leu-Cit*, -Cit-Leu*, -Ile-Cit*, -Phe-Ala*, -Ala-Phe*, -Phe-N⁹-tosil-Arg*, -N⁹-tosil-Arg-Phe*, -Phe-N⁹-nitro-Arg*, -N⁹-nitro-Arg-Phe*, -Phe-Phe-Lys*, -Lys-Phe-Phe*, -Gly-Phe-Lys*, -Lys-Phe-Gly*, -Leu-Ala-Leu*, -Ile-Ala-Leu*, -Leu-Ala-Ile*, -Val-Ala-Val*, -Ala-Leu-Ala-Leu*, -Leu-Ala-Leu-Ala*, -β-Ala-Leu-Ala-Leu*, -Gly-Phe-Leu-Gly*, -Gly-Leu-Phe-Gly*, -Val-Arg*, -Arg-Val*, -Arg-Arg*, -Ala-Ala*, -Ala-Met*, -Met-Ala*, -Thr-Thr*, -Thr-Met*, -Met-Thr*, -Leu-Ala*, -Ala-Leu*, -Cit-Val*, -Gln-Val*, -Val-Gln*, -Ser-Val*, -Val-Ser*, -Ser-Ala*, -Ser-Gly*, -Ala-Ser*, -Gly-Ser*, -Leu-Gln*, -Gln-Leu*, -Phe-Arg*, -Arg-Phe*, -Tyr-Arg*, -Arg-Tyr*, -Phe-Gln*, -Gln-Phe*, -Val-Thr*, -Thr-Val*, -Met-Tyr* y -Tyr-Met*.

- 55 En algunas realizaciones, -(AA¹)-(AA²)_{a1}* es -Val-D-Lys*, -Val-D-Arg*, -L-Val-Cit*, -L-Val-Lys*, -L-Val-Arg*, -L-Val-D-Cit*, -L-Phe-Phe-Lys*, -L-Val-D-Lys*, -L-Val-D-Arg*, -L-Arg-D-Arg*, -L-Ala-Ala*, -L-Ala-D-Ala*, -Ala-D-Ala*, -Val-D-Cit*, -L-Ala-L-Ala*, -L-Ala-L-Val*, -L-Gln-L-Val*, -L-Gln-L-Leu* o -L-Ser-L-Val*.

- 60 En algunas realizaciones, -(AA¹)-(AA²)_{a1}* es: -Ala-Ala*, -Ala-Val*, -Val-Ala*, -Gln-Leu*, -Leu-Gln*, -Ala-Ala-Ala*, -Ala-Ala-Ala-Ala*, -Gly-Ala-Gly-Gly*, -Gly-Gly-Ala-Gly*, -Gly-Val-Gly-Gly*, -Gly-Gly-Val-Gly*, -Gly-Phe-Gly-Gly* o -Gly-Gly-Phe-Gly*.

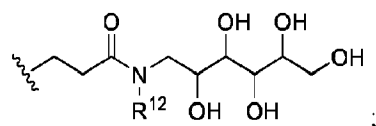
En algunas realizaciones, $-AA^1-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-L-Ala-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Gln-L-Leu-*, -L-Gln-D-Leu-*, -L-Leu-L-Gln-*, -L-Leu-D-Gln-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -Gly-L-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Ala-Gly-*, -Gly-D-Ala-Gly-Gly-*, Gly-Gly-D-Ala-Gly-*, -Gly-L-Val-Gly-Gly-*, Gly-Gly-L-Val-Gly-*, -Gly-D-Val-Gly-Gly-*, Gly-Gly-D-Val-Gly-*, -Gly-L-Phe-Gly-Gly-* o Gly-Gly-L-Phe-Gly-*.

En algunas realizaciones, $-AA^1-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-* o -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*.

En las diversas realizaciones que describen $-AA^1-(AA^2)_{a1}-*$ en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a E.

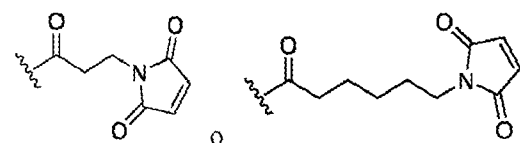
En algunas realizaciones, A está sustituido con uno o más polioles, que son $-(\text{alquilen } C_1-C_6)-X^5-Y^3$; en donde: X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}-$; Y^3 es $-\text{alquilo } C_1-C_{10}$, donde Y^3 está sustituido con 0-10 grupos OH; y R^{12} es -H, alquilo C_1-C_6 , fluoroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo, heteroarilo o bencilo.

En algunas realizaciones, en donde el poliol es



en donde R^{12} es H o metilo.

E es $-C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_{10})-X^3$. En algunas realizaciones, E es



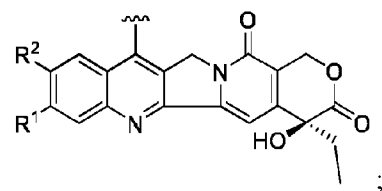
En algunas realizaciones, el compuesto es uno cualquiera de los compuestos seleccionados de la Tabla 2.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula III, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

CBA-E'-A-Z'-L¹-D (Fórmula III)

en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:



R^1 es -F;

R^2 es metilo;

$-L^1-Z'-*$ es (i) $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-O-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-S-CH_2-NR^8-*$, o $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-NR^8-*$, o (ii) $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-O-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$, o $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^8-*$, donde * es el sitio unido covalentemente a A;

cada R^5 es independientemente -H, metilo o bencilo;

cada R^8 es independientemente -H, metilo o bencilo;

A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

- 5 (i) $-(\text{alquilen } C_1-C_6)-X^5-Y^3$, en donde:

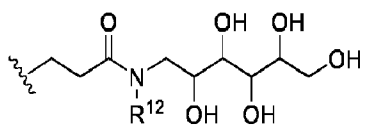
X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}-$;

Y^3 es $-\text{alquilo } C_1-C_{10}$, donde Y^3 está sustituido con 0-10 grupos OH; y

10

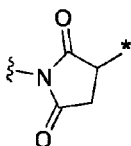
R^{12} es $-H$, alquilo C_1-C_6 , fluoroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo, heteroarilo o bencilo; o

(ii)



15

en donde R^{12} es H o metilo; E' es $-C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_{10})-X^6-*$; donde $*$ es el sitio unido covalentemente a CBA; X^6 es



20

donde $*$ es el sitio unido covalentemente a CBA; y CBA es un agente de unión a células, en donde el agente de unión a células es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 25 En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-O-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-S-CH_2-NR^8-*$, o $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-O-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-S-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_4)-NR^8-*$.

- 30 En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-CH_2O-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_2O-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_3O-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_4O-CH_2NH-*$, $-CH_2S-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_2S-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_3S-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_4S-CH_2NH-*$, $-CH_2NH-*$, $-(CH_2)_2NH-*$, $-(CH_2)_3NH-*$ o $-(CH_2)_4NH-*$.

- 35 En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-O-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$, o $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-O-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8-*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^8-*$.

- 40 En algunas realizaciones, $-L^1-Z'-*$ es $-CH_2NHC(=O)CH_2O-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_2O-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_3O-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_4O-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_5O-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)CH_2S-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_2S-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_3S-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_4S-CH_2NH-*$, $-CH_2NHC(=O)(CH_2)_5S-CH_2NH-*$, $-CH_2SCH_2S-CH_2NH-*$, $-CH_2S(CH_2)_2S-CH_2NH-*$, $-CH_2S(CH_2)_3S-CH_2NH-*$, $-CH_2S(CH_2)_4S-CH_2NH-*$ o $-CH_2S(CH_2)_5S-CH_2NH-*$.

45

Cada R^5 es independientemente $-H$, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R^5 es independientemente $-H$. En algunas realizaciones, cada R^5 es metilo. En algunas realizaciones, cada R^5 es bencilo. Cada R^8 es independientemente $-H$, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R^8 es independientemente $-H$. En algunas realizaciones, cada R^8 es metilo. En algunas realizaciones, cada R^8 es bencilo.

50

En las diversas realizaciones que describen $-L^1-Z'-*$ en el presente documento, $*$ es el sitio unido covalentemente a A.

- 55 En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, cada aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido D.

En algunas realizaciones, A es $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$, donde * es el punto de unión a E', AA^1 y AA^2 son cada uno independientemente un resto de aminoácido; y a1 es un número entero de 1-9.

- 5 En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Val-Cit-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Phe-Cit-*, -Cit-Phe-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Ile-Cit-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Phe-N⁹-tosil-Arg-*, -N⁹-tosil-Arg-Phe-*, -Phe-N⁹-nitro-Arg-*, -N⁹-nitro-Arg-Phe-*, -Phe-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Phe-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Ile-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Ile-*, -Val-Ala-Val-*, -Ala-Leu-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Leu-Ala-*, -β-Ala-Leu-Ala-Leu-*, -Gly-Phe-Leu-Gly-*, -Gly-Leu-Phe-Gly-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Ala-Ser-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Met-Tyr-*, y -Tyr-Met-.*

- 15 En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es -Val-D-Lys-*, -Val-D-Arg-*, -L-Val-Cit-*, -L-Val-Lys-*, -L-Val-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Phe-Phe-Lys-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -Ala-D-Ala-*, -Val-D-Cit-*, -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Gln-L-Val-*, -L-Gln-L-Leu-*, o -L-Ser-L-Val-.*

- 20 En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -Ala-Ala-*, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gln-Leu-*, -Leu-Gln-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Ala-Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Ala-Gly-*, -Gly-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Gly-Gly-*, o -Gly-Gly-Phe-Gly-.*

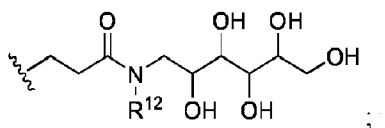
- 25 En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-L-Ala-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Gln-L-Leu-*, -L-Gln-D-Leu-*, -L-Leu-L-Gln-*, -L-Leu-D-Gln-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -Gly-L-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Ala-Gly-*, -Gly-D-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Ala-Gly-*, -Gly-L-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Val-Gly-*, -Gly-D-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Val-Gly-*, -Gly-L-Phe-Gly-Gly-*, o -Gly-Gly-L-Phe-Gly-.*

- 30 En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, o -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-.*

En las diversas realizaciones que describen $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a E'.

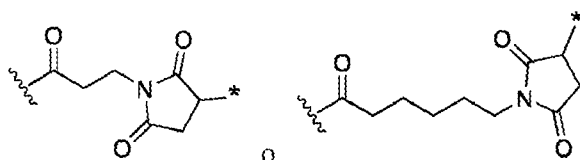
- 35 En algunas realizaciones, A está sustituido con uno o más polioles, que son $-(\text{alquilen } C_1-C_6)-X^5-Y^3$; en donde: X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}-$; Y^3 es $-\text{alquilo } C_1-C_{10}$, donde Y^3 está sustituido con 0-10 grupos OH; y R^{12} es -H, alquilo C_1-C_6 , fluoroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo, heteroarilo o bencilo.

- 40 En algunas realizaciones, el poliol es



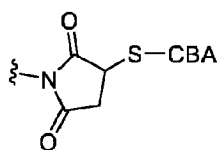
en donde R^{12} es H o metilo.

- 45 E' es $-C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_{10})-X^6-*$. En algunas realizaciones, E' es



- 50 donde * es el sitio unido covalentemente a CBA.

En algunas realizaciones, el CBA comprende un grupo -SH que se une covalentemente con E' para proporcionar



En algunas realizaciones, el CBA es un anticuerpo y -E'-A-Z'-L¹-D es una estructura de fármaco-enlazador, el número medio de estructuras de fármaco-enlazador conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 2 a 10.

5

En algunas realizaciones, el número medio de estructuras de fármaco-enlazador conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 2 a 10. En algunas realizaciones, el número medio de estructuras de fármaco-enlazador conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 6 a 8. En algunas realizaciones, el número medio de estructuras de fármaco-enlazador conjugadas por anticuerpo es 8.

10

En algunas realizaciones, el CBA es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, una anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana, un procuerpo, un nanocuerpo o un hexacuerpo.

15

En algunas realizaciones, el CBA se une a células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunitarias, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o melanocitos; células que expresan uno cualquiera o más del antígeno 5T4, ADAM-9, ALK, AMHR11, ASCT2, Axl, B7-H3, BCMA, C4,4a, CA6, CA9, CanAg, CD123, CD138, CD142, CD166, CD184, CD19, CD20, CD205, CD22, CD248, CD25, CD3, CD30, CD33, CD352, CD37, CD38, CD40L, CD44v6, CD45, CD46, CD48, CD51, CD56, CD7, CD70, CD71, CD74, CD79b, CDH6, CEACAM5, CEACAM6, cKIT, CLDN18,2, CLDN6, CLL-1, c-MET, Cripto, CSP-1, CXCR5, DLK-1, DLL3, DPEP3, Disadherina, EFNA4, EGFR, EGFRviii, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, ETBR, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR-alfa, FSH, GCC, GD2, GD3, Globo H, GPC-1, GPC3, gpNMB, HER-2, HER-3, HLA-DR, HSP90, IGF-1R, IL-13R, IL1RAP, IL7R, receptor de interleucina-4 (IL4R), KAAG-1, LAMP-1, antígeno de Lewis Y, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, LIV-1, LRP-1, LRRC15, Ly6E, MAGE, mesotelina (MSLN), MET, proteína A y B relacionada con la cadena I de MHC (MICA y MICB) MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, NOTCH3, OAcGD2, OX001L, p-Cadherina, PD-L1, fosfatidil serina (PS), mucina epitelial polimórfica (PEM), receptor de prolactina (PRLR), PSMA, PTK7, RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SSTR2, STEAP-1, STING, STn, TIM-1, TM4SF1, TNF-alfa, TRA, TROP-2, glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), epítipo específico de tumor de mucina-1 (TA-MUC1), CD5, TIM-3, UPK2 o UPK1b.

35

En algunas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo anti-receptor de folato o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo anti-CD33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo anti-EpCAM o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de anticuerpo del mismo, un anticuerpo anti-Muc1 o un fragmento de anticuerpo del mismo, o un anticuerpo anti-CD37 o un fragmento de anticuerpo del mismo.

40

La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto citotóxico o un conjugado de la presente invención descrito en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los presentes compuestos, conjugados o composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo (p. ej., cáncer), un trastorno autoinmunitario, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad renal en un mamífero (p. ej., ser humano).

45

Los presentes compuestos, conjugados o composiciones son útiles para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite. En ciertas realizaciones, el cáncer es un linfoma o una leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfoblástica B aguda o leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia promielocítica aguda (APL), enfermedad linfoproliferativa crónica de células B (B-CLPD), leucemia linfocítica crónica atípica, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), leucemia de células del manto (MCL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer mieloide, melanoma y cáncer linfóide. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es

60

cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

También se describe en el presente documento, pero no según la invención reivindicada, el uso de un compuesto citotóxico, un conjugado, o una composición de la presente invención para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo (p. ej., cáncer), un trastorno autoinmunitario, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad renal en un mamífero (p. ej., ser humano).

Los presentes compuestos, conjugados o composiciones son útiles para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite. En ciertas realizaciones, el cáncer es un linfoma o una leucemia. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfoblástica B aguda o leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia promielocítica aguda (APL), enfermedad linfoproliferativa crónica de células B (B-CLPD), leucemia linfocítica crónica atípica, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), leucemia de células del manto (MCL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer mieloide, melanoma y cáncer linfóide. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 representa la primera parte de la síntesis de unidades estructurales de camptotecina.
- La FIG. 2 representa la segunda parte de la síntesis de unidades estructurales de camptotecina.
- La FIG. 3 representa la primera parte de la síntesis de las cadenas laterales.
- La FIG. 4 representa la segunda parte de la síntesis de las cadenas laterales.
- La FIG. 5 representa la primera parte del acoplamiento de las unidades estructurales de camptotecina con las cadenas laterales.
- La FIG. 6 representa la segunda parte del acoplamiento de las unidades estructurales de camptotecina con las cadenas laterales.
- La FIG. 7 representa la tercera parte del acoplamiento de las unidades estructurales de camptotecina con las cadenas laterales.
- La FIG. 8 representa la síntesis de metabolitos adicionales de camptotecina.
- La FIG. 9 representa el acoplamiento de unidades estructurales de camptotecina con cadenas laterales.
- La FIG. 10 representa la síntesis de compuestos adicionales de camptotecina.
- La FIG. 11 representa compuestos usados para comparación, que incluyen una estructura genérica Ab-999 de un ADC que lleva el resto 999 unido a través de disulfuros intercadena reducidos de un anticuerpo.
- La FIG. 12 representa la citotoxicidad del compuesto que lleva sulfuro 8c y su sulfóxido 34a y sulfona 34b.
- La FIG. 13 representa la farmacocinética de ML66-999 en ratones. El panel superior representa gráficos de concentración ($\mu\text{g/mL}$) frente al tiempo del componente mAb (promedio), y el componente de carga activa, en los puntos de tiempo de 2 min, 1 día y 3 días después de la administración en ratones. El panel inferior representa gráficos de concentración ($\mu\text{g/mL}$) frente al tiempo del componente mAb (promedio), y bioactividad retenida (muestras agrupadas), de los ADC en los puntos de tiempo de 2 min, 1 día y 3 días después de la administración en ratones.
- La FIG. 14 representa la farmacocinética de ML66-22a en ratones. El panel superior representa gráficos de concentración ($\mu\text{g/mL}$) frente al tiempo del componente mAb (promedio), y el componente de carga activa, en los puntos de tiempo de 2 min, 1 día y 3 días después de la administración en ratones. El panel inferior representa gráficos de concentración ($\mu\text{g/mL}$) frente al tiempo del componente mAb (promedio), y bioactividad retenida (muestras agrupadas), de los ADC en los puntos de tiempo de 2 min, 1 día y 3 días después de la administración en ratones.

La FIG. 15 representa las citotoxicidades in vitro de los ADC contra las células Ag+ y Ag-. ADC de referencia en la formulación (referencia) o suero sanguíneo (agrupado) que contiene ADC tomado a los 2 min, 1 día o 3 días después de la administración en ratones para ML66-999.

5

La FIG. 16 representa las citotoxicidades in vitro de los ADC contra las células Ag+ y Ag-. ADC de referencia en la formulación (referencia) o suero sanguíneo (agrupado) que contiene ADC tomado a los 2 min, 1 día o 3 días después de la administración en ratones para ML66-22a.

10 La FIG. 17 representa la eficacia de los ADC en un modelo de xenoinjerto de HSC-2. La dosificación se basa en la carga activa (75 µg/kg y 250 µg/kg son ~3 mg/kg y ~10 mg/kg basado en el anticuerpo).

La FIG. 18 representa la eficacia de los ADC en modelos de xenoinjerto de FaDu. La dosificación se basa en la carga activa (75 µg/kg y 250 µg/kg son ~3 mg/kg y ~10 mg/kg basado en el anticuerpo).

15

La FIG. 19 representa la tolerabilidad del ratón a los ADC ML66-999, ML66-22a y ML66-28a.

La FIG. 20 representa la actividad antitumoral de los ADC en un modelo de xenoinjerto de ratón H1703. La dosificación se basa en la carga activa (75 µg/kg y 250 µg/kg son ~3 mg/kg y ~10 mg/kg basado en el anticuerpo).

20

La FIG. 21 representa la tolerabilidad en ratones de los ADC sin reactividad cruzada en una dosis de carga activa de 5000 µg/kg (-200 mg/kg basado en el componente Ab). Ab_F = anticuerpo anti-receptor de folato humanizado.

25

Descripción detallada

Con el fin de que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse completamente, se expone la siguiente descripción detallada. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones mencionadas, se entenderá que no pretenden limitar la invención a tales realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento que se podrían utilizar en la práctica de la presente invención.

35

La expresión "en el presente documento" significa toda la solicitud.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en esta solicitud tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en relación con los compuestos, composición y métodos descritos en el presente documento, son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica.

40

Debe entenderse que cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, incluidas las descritas en diferentes aspectos de la invención y diferentes partes de la memoria descriptiva (incluidas las realizaciones descritas solo en los ejemplos) se pueden combinar con una o más realizaciones diferentes de la invención, a menos que sea explícitamente negado o sea inadecuado. La combinación de realizaciones no se limita a las combinaciones específicas reivindicadas mediante las múltiples reivindicaciones dependientes.

45

Los términos de química utilizados en el presente documento se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ilustra por "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

50

A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes), pero no la exclusión de cualquier otro número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes).

55

A lo largo de la memoria descriptiva, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen, o comprenden (o variaciones de las mismas), componentes específicos, se contempla que las composiciones también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, los componentes mencionados. De manera similar, cuando se describe que los métodos o procedimientos tienen, incluyen o comprenden etapas de procedimiento específicas, los procedimientos también pueden consistir esencialmente en, o consistir en, las etapas de procesamiento mencionadas. Además, debe entenderse que el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones es irrelevante siempre que las composiciones y métodos descritos en el presente documento permanezcan operables. Además, se pueden llevar a cabo dos o más etapas o acciones simultáneamente.

60

65

La expresión "que incluye" se usa para significar "que incluye pero no se limita a". "Que incluye" y "que incluye pero no se limita a" se utilizan de manera intercambiable.

- 5 Como se usa en el presente documento, "aproximado" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición.

- 10 El uso de los términos "un", "una" y "el", "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe considerarse que incluye tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

- 15 El término "o" como se usa en el presente documento debe entenderse que significa "y/o", salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

- 20 Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento sirva solamente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente comprendido en el intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que se contradiga de otro modo claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones ilustrativas (p. ej., "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende simplemente iluminar mejor las realizaciones y no plantea una limitación en el alcance de las reivindicaciones a menos que se indique lo contrario. No se debe interpretar ninguna expresión de la memoria descriptiva como indicación de que algún elemento no reivindicado sea esencial.

Definiciones

- 30 El término "alquilo" o "alquilo lineal o ramificado" como se usa en el presente documento se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o ramificado saturado. En realizaciones preferidas, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene treinta o menos átomos de carbono (p. ej., C_1-C_{30} para el grupo alquilo de cadena lineal y C_3-C_{30} para el alquilo ramificado), y más preferiblemente veinte o menos átomos de carbono. Incluso más preferiblemente, el alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene diez o menos átomos de carbono (es decir, C_1-C_{10} para el grupo alquilo de cadena lineal y C_3-C_{10} para el alquilo ramificado). En otras realizaciones, el alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono (es decir, C_1-C_6 para el grupo alquilo de cadena lineal o C_3-C_6 para el alquilo de cadena ramificada). Los ejemplos de alquilo, incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, - $CH_2CH(CH_3)_2$, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo, 1-octilo, y similares. Además, el término "alquilo" como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones pretende incluir tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", el último de los cuales hace referencia a restos alquilo que tienen sustituyentes que rempazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal del hidrocarburo. Como se usa en el presente documento, alquilo (C_x-C_{xx}) o alquilo C_{x-xx} significa un alquilo lineal o ramificado que tiene un número x-xx de átomos de carbono.

- 50 El término "alquilenilo" como se usa en el presente documento se refiere a un radical hidrocarbonado divalente lineal o ramificado saturado. En realizaciones preferidas, un alquilenilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene treinta o menos átomos de carbono (p. ej., C_1-C_{30} para el grupo alquilenilo de cadena lineal y C_3-C_{30} para el alquilenilo ramificado), y más preferiblemente veinte o menos átomos de carbono. Incluso más preferiblemente, el alquilenilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene diez o menos átomos de carbono (es decir, C_1-C_{10} para el grupo alquilenilo de cadena lineal y C_3-C_{10} para el alquilenilo ramificado). En otras realizaciones, el alquilenilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono (es decir, C_1-C_6 para el grupo alquilenilo de cadena lineal o C_3-C_6 para el alquilenilo de cadena ramificada). Como se usa en el presente documento, alquilenilo(C_x-C_{xx}) o alquilenilo C_{x-xx} significa un alquilenilo lineal o ramificado que tiene un número x-xx de átomos de carbono.

- 60 El término "alquenilo" o "alquenilo lineal o ramificado" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, en donde el radical alquenilo incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etilenilo o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$), y similares. Preferiblemente, el alquenilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

- 65 El término "alquinilo" o "alquinilo lineal o ramificado" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o ramificado de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace

carbono-carbono. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo y similares. Preferiblemente, el alquinilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferiblemente, el alquinilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

- 5 Las expresiones "alquilo cíclico" y "cicloalquilo" se pueden utilizar indistintamente. Como se usa en el presente documento, el término se refiere al radical de un anillo carbocíclico saturado. En realizaciones preferidas, los cicloalquilos tienen de 3 a 10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y más preferiblemente de 5 a 7 átomos de carbono en la estructura de anillo. En algunas realizaciones, los dos anillos cíclicos pueden tener dos o más átomos en común, p. ej., los anillos son "anillos condensados". Los cicloalquilos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cicloheptilo, ciclohexilo, ciclopentilo, ciclobutilo y ciclopropilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo es un grupo monocíclico. En algunas realizaciones, el cicloalquilo es un grupo bicíclico. En algunas realizaciones, el cicloalquilo es un grupo tricíclico.

- 10 El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo descrito anteriormente que está sustituido con un grupo cicloalquilo.

La expresión "alquenilo cíclico" se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un doble enlace en la estructura del anillo.

- 20 La expresión "alquinilo cíclico" se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un triple enlace en la estructura del anillo.

- El término "arilo" o "anillo aromático", como se usa en el presente documento, incluye grupos aromáticos de un solo anillo sustituidos o no sustituidos en los que cada átomo del anillo es carbono. Preferiblemente, el anillo es un anillo de 5 a 7 miembros, más preferiblemente un anillo de 6 miembros. Los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, fenol, anilina y similares. Los términos "arilo" también incluyen sistemas de anillos "policíclico", "policiclo" y "policíclicos" que tienen dos o más anillos en los que dos o más átomos son comunes a dos anillos contiguos, p. ej., los anillos son "anillos condensados", en donde al menos uno de los anillos es aromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquilenos, cicloalquilinos o anillos aromáticos. En algunas realizaciones preferidas, los policiclos tienen 2-3 anillos. En ciertas realizaciones preferidas, los sistemas de anillos policíclicos tienen dos anillos cíclicos en los que ambos de los anillos son aromáticos. Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, cada anillo del policiclo contiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo, preferiblemente de 5 a 7. Por ejemplo, los grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, tolilo, antraceno, fluorenilo, indenilo, azuleno y naftilo, así como restos carbocíclicos benzocondensados tales como 5,6,7,8-tetrahidronaftilo y similares. En algunas realizaciones, el arilo es un grupo aromático de un solo anillo. En algunas realizaciones, el arilo es un grupo aromático de dos anillos. En algunas realizaciones, el arilo es un grupo aromático de tres anillos.

- El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más átomos de la cadena principal del alquilo se seleccionan de un átomo distinto de carbono, p. ej., O, S, N (p. ej., -NH, -N(alquilo)-), o combinaciones de los mismos. Un heteroalquilo se une al resto de la molécula en un átomo de carbono del heteroalquilo. En un aspecto, un heteroalquilo es un heteroalquilo C₁-C₃₀. Un heteroalquilo C₁-C₃₀ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono y de 1 a 15 heteroátomos. Los ejemplos de grupos heteroalquilo C₁-C₃₀ incluyen, pero no se limitan a, éteres (p. ej., -CH₂-O-CH₃, -(CH₂)₂-O-CH₃, -(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-CH₃, -(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-CH₃, CH₂-O-CH₂-O-CH₃, -CH₂-O-(CH₂)₃-O-CH₃), derivados de polietilenglicol (PEG) (p. ej., -[(CH₂)₂O]₁₀CH₂CH₃), tioéteres (p. ej., -CH₂-S-CH₃, -(CH₂)₂-S-CH₃, -(CH₂)₃-S-(CH₂)₂CH₃, -((CH₂)₂S)₁₀CH₂CH₃), -CH₂-S-S-CH₂, -(CH₂)₂-S-(CH₂)₃CH₃, CH₂-S-CH₂-S-CH₃, -CH₂-S-(CH₂)₃-S-CH₃), aminas (p. ej., -CH₂-NH-CH₃, -(CH₂)₂-N(alquil)-CH₃, -(CH₂)₃-NH-(CH₂)₂CH₃, -(CH₂)₂-N(alquil)-(CH₂)₃CH₃, CH₂-NH-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-NH-(CH₂)₃-NH-CH₃), o combinaciones de los mismos. Esta descripción también contempla grupos heteroalquilo C₁-C₃₀ en donde uno de los 1 a 15 heteroátomos ocupa la posición terminal del grupo alquilo, dando como resultado, por ejemplo, un alcohol (es decir, OH), tiol (es decir, SH) o amina (p. ej., -NH₂) en la posición terminal del resto.

- El término "heteroalquenilo" se refiere a un grupo alquenilo como se define en el presente documento, en el que uno o más de los átomos de carbono se han reemplazado por un heteroátomo, p. ej., O, S, N (p. ej., -NH, -N(alquilo)-). Un heteroalquenilo está unido al resto de la molécula en un átomo de carbono del heteroalquenilo. En un aspecto, un heteroalquenilo es un heteroalquenilo C₁-C₃₀. Un heteroalquenilo C₁-C₃₀ se refiere a un grupo alquenilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono y de 1 a 15 heteroátomos, por ejemplo, de 1 a 10 heteroátomos o de 1 a 5 heteroátomos. Esta descripción también contempla grupos heteroalquenilo C₁-C₃₀ en donde uno de los 1 a 15 heteroátomos ocupa la posición terminal del grupo alquenilo, dando como resultado, por ejemplo, un alcohol (es decir, OH), tiol (es decir, SH) o amina (p. ej., -NH₂) o imina (-C=N) en la posición terminal del resto.

- El término "heteroalquinilo" se refiere a un grupo alquenilo como se define en el presente documento, en el que uno o más de los átomos de carbono se han sustituido por un heteroátomo, p. ej., O, S, N (p. ej., -NH, -N(alquilo)-). Un heteroalquinilo está unido al resto de la molécula en un átomo de carbono del heteroalquinilo.

En un aspecto, un heteroalquinilo es un heteroalquinilo C₁-C₃₀. Un heteroalquenilo C₁-C₃₀ se refiere a un grupo alquinilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono y de 1 a 15 heteroátomos, por ejemplo, de 1 a 10 heteroátomos o de 1 a 5 heteroátomos. Esta descripción también contempla grupos heteroalquinilo C₁-C₃₀ en donde uno de los 1 a 15 heteroátomos ocupa la posición terminal del grupo alquinilo, dando como resultado, por ejemplo, un alcohol (es decir, OH), tiol (es decir, SH) o amina (p. ej., -NH₂) o nitrilo (-C≡N) en la posición terminal del resto.

Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" como se usan en el presente documento, se refieren a estructuras de anillo no aromáticas sustituidas o no sustituidas, de anillos de 3 a 18 miembros, preferiblemente anillos de 3 a 10 miembros, más preferiblemente anillos de 3 a 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen al menos un heteroátomo, preferiblemente de uno a cuatro heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. En ciertas realizaciones, la estructura de anillo puede tener dos anillos cíclicos. En algunas realizaciones, los dos anillos cíclicos pueden tener dos o más átomos en común, p. ej., los anillos son "anillos condensados". Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, lactonas, lactamas y similares. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en particular en los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566. Ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofurano, dihidrofurano, tetrahidrotieno, tetrahidropirano, dihidropirano, tetrahidrotiopirano, tiomorfolina, tioxano, homopiperazina, azetidina, oxetano, tietano, homopiperidina, piperidina, piperazina, pirrolidina, morfolina, oxepano, tiepano, oxazepina, diazepina, tiazepina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, indolina, 2H-pirano, 4H-pirano, dioxano, 1,3-dioxolano, pirazolina, ditiano, ditiolano, dihidropirano, dihidrotieno, dihidrofurano, pirazolidinilimidazolina, imidazolidina, 3-azabicyclo[3.1.0]hexano, 3-azabicyclo[4.1.0]heptano y azabicyclo[2.2.2]hexano. Los restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Ejemplos de un grupo heterocíclico en donde los átomos del anillo están sustituidos con restos oxo (=O) son pirimidinona y 1,1-dioxo-tiomorfolina.

El término "heteroarilo" o "anillo heteroaromático" como se usa en el presente documento, se refiere a estructuras de un solo anillo aromáticas sustituidas o no sustituidas, preferiblemente anillos de 6 a 18 miembros, preferiblemente anillos de 5 a 7 miembros, más preferiblemente anillos de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen al menos un heteroátomo (p. ej., O, N o S), preferiblemente de uno a cuatro o de uno a tres heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. Cuando dos o más heteroátomos están presentes en un anillo de heteroarilo, pueden ser iguales o diferentes. El término "heteroarilo" también incluye sistemas de anillos "policiclilo", "policiclo" y "policíclicos" que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más átomos del anillo son comunes a dos anillos contiguos, p. ej., los anillos son "anillos condensados", en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroaromáticos y/o heterociclos. En algunas realizaciones preferidas, los heteroarilos policíclicos tienen 2-3 anillos. En ciertas realizaciones, los heteroarilos policíclicos preferidos tienen dos anillos cíclicos en los que ambos anillos son aromáticos. En ciertas realizaciones, cada anillo del policiclo contiene de 3 a 10 átomos en el anillo, preferiblemente de 5 a 7 átomos en el anillo. Por ejemplo, los grupos heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina, quinolina, pirimidina, indolizina, indol, indazol, bencimidazol, benzotiazol, benzofurano, benzotiofeno, cinolina, ftalazina, quinazolina, carbazol, fenoxazina, quinolina, purina y similares. En algunas realizaciones, el heteroarilo es un grupo aromático de un solo anillo. En algunas realizaciones, el heteroarilo es un grupo aromático de dos anillos. En algunas realizaciones, el heteroarilo es un grupo aromático de tres anillos.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos por carbono (unido a carbono) o nitrógeno (unido a nitrógeno) donde sea posible. A modo de ejemplo, y no de limitación, los heteroarilos o heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3 o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo, y no de limitación, los heteroarilos o heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolidina, 3-imidazolidina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina y posición 9 de un carbazol u O-carbolina.

Los heteroátomos presentes en el heteroarilo o heterociclilo incluyen las formas oxidadas tales como NO, SO y SO₂.

En algunas realizaciones, el anillo heteroaromático es un anillo de 5 a 18 miembros.

El término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I). En algunas realizaciones, el halógeno es flúor. En algunas realizaciones, el halógeno es cloro. En algunas realizaciones, el halógeno es bromo. En algunas realizaciones, el halógeno es yodo. Como se usa en el presente documento, el término "haloalquilo" se refiere a un alquilo, como se define en el presente documento, que está sustituido con uno o más grupos halógeno como se definen en el presente documento. El haloalquilo puede ser monohaloalquilo, dihaloalquilo o polihaloalquilo. Un monohaloalquilo puede tener un sustituyente fluoro, cloro, bromo o yodo. El dihaloalquilo o polihaloalquilo puede estar sustituido con dos o más de los mismos átomos de halógeno o una combinación de diferentes grupos halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difloropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo.

El término "alcoxi" utilizado en el presente documento se refiere a alquil-O-, en donde el alquilo se define anteriormente en el presente documento. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi, hexiloxi y similares.

El alquilo, haloalquilo, alcoxi, alqueno, alquino, alquilo cíclico, alqueno cíclico, alquino cíclico, carbocíclico, arilo, heterocíclico y heteroarilo descritos anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes.

A menos que se indique específicamente como "no sustituido", se entiende que las referencias a restos químicos en el presente documento también incluyen variantes sustituidas. Por ejemplo, la referencia a un grupo o resto "alquilo" incluye implícitamente variantes tanto sustituidas como no sustituidas. Los ejemplos de sustituyentes en restos químicos incluyen, pero no se limitan a, halógeno, hidroxilo, carbonilo (tal como carboxilo, alcoxicarbonilo, formilo o acilo), tiocarbonilo (tal como tioéster, tioacetato o tioformiato), alcoxilo, alquiltio, aciloxi, fosforilo, fosfato, fosfonato, amino, amido, amidina, imina, ciano, nitro, azido, sulfhidrilo, alquiltio, sulfato, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, sulfonilo, heterocíclico, aralquilo o resto arilo o heteroarilo.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede ocurrir o no, de modo que la solicitud incluye casos en los que la circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, la frase "opcionalmente sustituido" significa que puede o no estar presente un sustituyente no hidrógeno en un átomo dado, y, por lo tanto, la solicitud incluye estructuras en donde está presente un sustituyente no hidrógeno y estructuras en donde no está presente un sustituyente no hidrógeno.

El término "sustituido" se refiere a restos que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre. Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución concuerda con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, p. ej., que no experimenta espontáneamente una transformación tal como por transposición, ciclación, eliminación, etc. Tal como se usa en el presente documento, está contemplado que el término "sustituido" incluya todos los sustituyentes admisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes admisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes admisibles pueden ser uno o más y pueden ser iguales o diferentes para los compuestos orgánicos adecuados. Para los fines de la invención, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualquier sustituyente admisible de compuestos orgánicos descritos en el presente documento que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Los sustituyentes pueden incluir cualquier sustituyente descrito en el presente documento, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcoxilo, un alquiltio, un aciloxi, un fosforilo, un fosfato, un fosfonato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterocíclico, un aralquilo o un resto aromático o heteroaromático. Para ilustrar, el monofluoroalquilo es alquilo sustituido con un sustituyente flúor y difluoroalquilo es alquilo sustituido con dos sustituyentes flúor. Se debe reconocer que, si hay más de una sustitución en un sustituyente, cada sustituyente distinto de hidrógeno puede ser igual o diferente (a menos que se indique otra cosa).

Si un carbono de un sustituyente se describe como que está opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el carbono (en caso de que haya) se pueden reemplazar por separado y/o juntos por un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Si un nitrógeno de un sustituyente se describe como que está opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el nitrógeno (en caso de que haya) se pueden reemplazar cada uno por un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Un sustituyente de ejemplo se puede describir como -NR'R'', en donde R' y R'' junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden formar un anillo heterocíclico. El anillo heterocíclico formado a partir de R' y R'' junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, puede estar parcial o totalmente saturado. En algunas realizaciones, el anillo heterocíclico consiste en 3 a 7 átomos. En otras realizaciones, el anillo heterocíclico se selecciona de pirrolilo, imidazolilo,

pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, piridilo y tiazolilo.

Esta memoria descriptiva utiliza los términos "sustituyente", "radical" y "grupo" indistintamente.

- 5 Si un grupo de sustituyentes se describen colectivamente como que están opcionalmente sustituidos con uno o más de una lista de sustituyentes, el grupo puede incluir: (1) sustituyentes no sustituibles, (2) sustituyentes sustituibles que no están sustituidos con los sustituyentes opcionales y/o (3) sustituyentes sustituibles que están sustituidos con uno o más de los sustituyentes opcionales.
- 10 Si un sustituyente se describe como que está opcionalmente sustituido con hasta un número particular de sustituyentes no hidrógeno, dicho sustituyente puede estar (1) no sustituido; o (2) sustituido con hasta ese número particular de sustituyentes no hidrógeno o con hasta el número máximo de posiciones sustituibles en el sustituyente, lo que sea inferior. Por lo tanto, por ejemplo, si un sustituyente se describe como un heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes no hidrógeno, entonces cualquier heteroarilo con menos de 3 posiciones sustituibles estaría opcionalmente sustituido con hasta solamente tantos sustituyentes no hidrógeno como las posiciones sustituibles que tenga el heteroarilo. Dichos sustituyentes, en ejemplos no limitativos, pueden seleccionarse de un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, guanidinio $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, un sulfóxido representado por $-SOR^{101}$, una sulfona representada por $-SO_2R^{101}$, un sulfonato $-SO_3M$, un sulfato $-OSO_3M$, una sulfonamida representada por $-SO_2NR^{101}R^{102}$, ciano, un azido, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$ y una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$ en donde M es H o un catión (tal como Na^+ o K^+); R^{101} , R^{102} y R^{103} se selecciona cada uno independientemente de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$, en donde n es un número entero de 1 a 24, un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono y un heteroarilo que tiene 5 a 10 átomos de carbono; y R^{104} es H o un alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 4 átomos de carbono, en donde el alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo en los grupos representados por R^{100} , R^{101} , R^{102} , R^{103} y R^{104} están opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, $-OH$, $-CN$, $-NO_2$ y alquilo lineal o ramificado no sustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono. Preferiblemente, los sustituyentes para el alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo cíclico, alquenilo cíclico, alquinilo cíclico, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos descritos antes incluyen halógeno, $-CN$, $-NR^{102}R^{103}$, $-CF_3$, $-OR^{101}$, arilo, heteroarilo, heterociclilo, $-SR^{101}$, $-SOR^{101}$, $-SO_2R^{101}$ y $-SO_3M$.
- 20
- 25
- 30
- 35 Para los sulfóxidos, representados por $-SOR^{101}$ como se indica en el párrafo anterior, están abarcados ambos isómeros ópticos (configuraciones R y S en el átomo de azufre del grupo sulfóxido).
- El número de átomos de carbono en un grupo puede estar especificado en el presente documento mediante el prefijo "C_{x-xx}" o "C_x-C_{xx}", en donde x y xx son números enteros. Por ejemplo, "alquilo C₁₋₄" o "alquilo C₁-C₄"
- 40 es un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.
- Los términos "compuesto" o "compuesto citotóxico", "dímero citotóxico" y "compuesto dímero citotóxico" se usan indistintamente. Estos pretenden incluir compuestos para los que se ha descrito una estructura o fórmula o cualquier derivado de esta en la presente invención. El término también incluye, estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, solvatos, metabolitos, sales (p. ej., sales farmacéuticamente aceptables) y profármacos y sales de profármacos de un compuesto de todas las fórmulas descritas en la presente invención. El término también incluye cualquier solvato, hidrato y polimorfo de cualquiera de los anteriores. La mención específica de "estereoisómeros", "isómeros geométricos", "tautómeros", "solvatos", "metabolitos", "sal", "profármaco", "sal de profármaco", "conjugados", "sal de conjugados", "solvato", "hidrato" o "polimorfo" en
- 45 determinados aspectos de la invención descrita en esta solicitud no se debe interpretar como una omisión intencionada de estas formas en otros aspectos de la invención en donde el término "compuesto" se utiliza sin mención de estas otras formas.
- 50
- El término "conjugado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto descrito en el presente documento o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión a células.
- 55
- El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no ser superponibles con su pareja imagen especular, mientras que el término "aquiral" hace referencia a moléculas que son superponibles con su pareja imagen especular.
- 60
- El término "estereoisómero" se refiere a compuestos que tienen constitución química y conectividad idénticas, pero diferentes orientaciones espaciales de sus átomos que no se pueden interconvertir mediante rotación en torno a enlaces simples.
- 65
- El término "diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, p.

ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Se pueden separar mezclas de diastereómeros mediante procedimientos analíticos de alta resolución tales como cristalización, electroforesis y cromatografía.

- 5 El término "enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las definiciones estereoquímicas y convenciones que se utilizan en el presente documento siguen generalmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros quirales o asimétricos y, por lo tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que formen parte de la presente invención todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S se utilizan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para indicar el signo de rotación de la luz polarizada plana por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo que son imágenes especulares uno del otro. También se puede referir a un estereoisómero específico como un enantiómero, y, a menudo, se hace referencia a una mezcla de dichos isómeros como una mezcla enantiomérica. Se hace referencia a una mezcla 50:50 de enantiómeros como mezcla racémica o racemato, y esta puede surgir cuando una reacción o proceso químico no es estereoselectiva o estereoespecífica. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas que carecen de actividad óptica.

Los términos "tautómero" o "forma tautomérica" se refieren a isómeros estructurales de energías diferentes que son interconvertibles a través de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros por transferencia de protones (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones a través de la migración de un protón, tal como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante la reorganización de algunos de los electrones del enlace.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Las sales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (p. ej., sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio) y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos donde los átomos con carga múltiple son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, se puede preparar la sal farmacéuticamente aceptable deseada mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido de piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa-hidroxiácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada se puede preparar por cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

Como se usa en el presente documento, el término "solvato" significa un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente tal como agua, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina diclorometano, 2-propanol o similares, unidos por fuerzas intermoleculares no covalentes. Los solvatos o hidratos de los compuestos se preparan fácilmente mediante la adición de al menos un equivalente molar de un disolvente hidroxílico tal como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol o agua al compuesto para dar como resultado la solvatación o hidratación del resto imina.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes comprendidos en una formulación y/o el mamífero que se trata con los mismos.

La expresión "grupo saliente" se refiere a un grupo de resto cargado o no cargado que sale durante una sustitución o desplazamiento. Dichos grupos salientes son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, halógenos, ésteres, alcoxi, hidroxilo, tosilatos, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, carbamato, disulfuros, tioéteres, tioésteres y compuestos de diazonio.

La expresión "éster reactivo" se refiere a un éster que tiene un grupo saliente fácilmente desplazable que puede reaccionar fácilmente con un grupo amina para formar un enlace amida. Los ejemplos de ésteres reactivos incluyen, pero no se limitan a, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxisulfosuccinimida, éster de nitrofenilo (p. ej., 2 o 4-nitrofenilo), éster de dinitrofenilo (p. ej., 2,4-dinitrofenilo), éster de sulfo-tetrafluorfenilo (p. ej., éster de 4 sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilo) o éster de pentafluorfenilo.

La expresión "grupo reactivo" se refiere a un grupo que puede reaccionar con un resto situado en otra molécula, tal como el agente de unión a células o el compuesto citotóxico, para formar un enlace covalente. El grupo reactivo incluye, pero no se limita a, un grupo reactivo con amina y un grupo reactivo con tiol.

La expresión "grupo reactivo con amina" se refiere a un grupo que puede reaccionar con un grupo amina para formar un enlace covalente. Ejemplos de grupos reactivos con amina incluyen, pero no se limitan a, grupos éster reactivos, haluros de acilo, haluros de sulfonilo, imidoésteres o grupos tioéster reactivos. En ciertas realizaciones, el grupo reactivo con amina es un grupo éster reactivo. En una realización, el grupo reactivo con amina es un éster de N-hidroxisuccinimida o un éster de N-hidroxisulfosuccinimida.

La expresión "grupo reactivo con tiol" se refiere a un grupo que puede reaccionar con un grupo tiol (-SH) para formar un enlace covalente. Ejemplos de grupos reactivos con tiol incluyen, pero no se limitan a, maleimida, haloacetilo, aloacetamida, vinilsulfona, vinilsulfonamida o vinilpiridina. En una realización, el grupo reactivo con tiol es maleimida.

La expresión "agente de reticulación bifuncional", "enlazador bifuncional" o "agentes de reticulación" se refiere a agentes modificadores que poseen dos grupos reactivos; uno de los cuales es capaz de reaccionar con un agente de unión a células mientras que el otro reacciona con el compuesto citotóxico para unir los dos restos entre sí. Dichos reticuladores bifuncionales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Isalm y Dent en *Bioconjugation*, capítulo 5, págs 218-363, Groves Dictionaries Inc. Nueva York, 1999). Por ejemplo, los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión a través de un enlace de tioéter incluyen 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) para introducir grupos maleimido o con 4-(yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. Otros agentes de reticulación bifuncionales que introducen grupos maleimido o grupos haloacetilo en un agente de unión a células son muy conocidos en la técnica (véanse las solicitudes de patente de EE. UU. 2008/0050310, 20050169933, disponible en Pierce Technology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, EE. UU.) e incluyen, pero no se limitan a, bis-maleimidopoli(etilenglicol) (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, éster de N-(β-maleimidopropiloxi)succinimida (BMPS), éster de N-succinimidilo del ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), NHS del ácido 5-maleimidovalérico, HBVS, 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) de N-succinimidilo, que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)-butírico o sal de HCl (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), éster de N-succinimidilo del ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB), 6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato de succinimidilo (SMPH), (4-vinilsulfonil)benzoato de succinimidilo (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDb), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), 4-(N-maleimido-metil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), (4-yodo-acetil)aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SIAB), éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), éster de N-(γ-maleimidobutirilo) sulfosuccinimida (sulfo-GMBS), éster de N-(ε-maleimidocaproilo) sulfosuccinimida (sulfo-EMCS), éster de N-(κ-maleimidoundecanoilo) sulfosuccinimida (sulfo-KMUS) y 4-(p-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB).

Los agentes de reticulación heterobifuncionales son agentes de reticulación bifuncionales que tienen dos

grupos reactivos diferentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales que contienen tanto un grupo *N*-hidroxysuccinimida (grupo NHS) reactivo con amina como un grupo hidrazina reactivo con carbonilo también se pueden utilizar para unir los compuestos citotóxicos descritos en el presente documento con un agente de unión a células (p. ej., anticuerpo). Los ejemplos de dichos agentes de reticulación heterobifuncionales disponibles en el mercado incluyen hidrazona de acetona de 6-hidrazinonicotinamida de succinimidilo (SANH), hidrocloreto de 4-hidrazidotereftalato de succinimidilo (SHTH) e hidrocloreto de nicotinato de hidrazinio de succinimidilo (SHNH). Los conjugados que llevan un enlazador lábil frente a ácidos también se pueden preparar utilizando un derivado de benzodiazepina que lleva hidrazina de la presente invención. Los ejemplos de agentes de reticulación bifuncionales que se pueden utilizar incluyen benzoato de succinimidil-p-formilo (SFB) y p-formilfenoxiacetato de succinimidilo (SFPA).

Los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión del agente de unión a células con compuestos citotóxicos mediante enlaces disulfuro se conocen en la técnica e incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP), 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB), 4-(2-piridilditio)2-sulfo-butanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. En la técnica se conocen otros agentes de reticulación bifuncionales que pueden usarse para introducir grupos disulfuro y se describen en las patentes de los EE. UU. 6,913,748, 6,716,821 y en las publicaciones de patentes de los EE. UU. 20090274713 y 20100129314. Alternativamente, también se pueden utilizar agentes de reticulación tales como 2-iminotiolano, tiolactona de homocisteína o anhídrido *S*-acetilsuccínico que introducen grupos tiol.

El término "enlazador", "resto enlazador" o "grupo de unión", según se define en el presente documento, se refiere a un resto que conecta dos grupos, tal como un agente de unión a células y un compuesto citotóxico entre sí. Típicamente, el enlazador es sustancialmente inerte en las condiciones para las cuales los dos grupos que conecta están unidos. Un agente de reticulación bifuncional puede comprender dos grupos reactivos, uno en cada extremo de un resto enlazador, de modo que se pueda hacer reaccionar primero un grupo reactivo con el compuesto citotóxico para proporcionar un compuesto que lleva el resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un agente de unión a células. Alternativamente, un extremo del agente de reticulación bifuncional se puede hacer reaccionar primero con el agente de unión a células para proporcionar un agente de unión a células que lleva un resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles frente a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles frente a peptidasa y enlaces lábiles frente a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 y 7,414,073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces tioéter y lábiles frente a peptidasa. Otros enlazadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, tales como los que se describen detalladamente en la publicación de EE. UU. número 20050169933, o enlazadores cargados o enlazadores hidrófilos y se describen en los documentos US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976.

La expresión "enlazador autoinmolador" se refiere a un enlazador que permitirá la liberación del compuesto citotóxico cuando se activa un sitio remoto. En ciertas realizaciones, el enlazador comprende una unidad de p-aminobencilo. En algunas de dichas realizaciones, un alcohol p-aminobencílico se une a una unidad de aminoácido a través de un enlace amida y se forma un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el fármaco (Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103). En algunas realizaciones, el enlazador comprende p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). Otros ejemplos de enlazadores autoinmoladores incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (patente de EE. UU. N.º 7,375,078; Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. En algunas realizaciones, se pueden usar espaciadores que sufren ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues y et al. (1995) *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] adecuadamente sustituidos (Storm et al. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al. (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). El enlace de un fármaco al carbono α de un resto de glicina es otro ejemplo de un enlazador autoinmolador que puede ser útil en ADC (Kingsbury et al. (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447).

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural o aminoácido de origen no natural. En algunas realizaciones, el aminoácido está representado por $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}})\text{-C(=O)OH}$, en donde R^{aa} y $\text{R}^{\text{aa'}}$ son cada uno independientemente H, un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterociclilo o R^{aa} y el átomo de nitrógeno N-terminal pueden formar conjuntamente un anillo heterocíclico (p. ej., como en la prolina). La expresión "resto de aminoácido" se refiere al resto correspondiente cuando se elimina un átomo de hidrógeno del extremo amina y/o carboxi del aminoácido, tal como $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}})\text{-C(=O)-}$.

El término "péptido" se refiere a cadenas cortas de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos

(amida). En algunas realizaciones, los péptidos contienen de 2 a 20 restos de aminoácidos. En otras realizaciones, los péptidos contienen de 2 a 10 o de 2 a 8 restos de aminoácidos. En otras realizaciones más, los péptidos contienen de 2 a 5 restos de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, cuando un péptido es una parte de un agente citotóxico o un enlazador descrito en el presente documento representado por una secuencia específica de aminoácidos, el péptido se puede conectar al resto del agente citotóxico o al enlazador en ambas direcciones.

El término "catión" se refiere a un ion con carga positiva. El catión puede ser monovalente (p. ej., Na^+ , K^+ , etc.), bivalente (p. ej., Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) o multivalente (p. ej., Al^{3+} etc.). Preferiblemente, el catión es monovalente.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos, anticuerpos biparatópicos, etc.), anticuerpos multivalentes (p. ej., anticuerpos trivalentes, tetravalentes, etc. que tienen tres, cuatro o más sitios de unión a antígeno) anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basados en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada a los que se hace referencia como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y conocidas. Los anticuerpos pueden encontrarse solos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc. Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" también incluye un anticuerpo activable (p. ej., un pro cuerpo). Por activable se entiende que el anticuerpo activable, presenta un primer nivel de unión a una diana cuando el anticuerpo activable, está en un estado inhibido, enmascarado, intacto o no escindido (es decir, una primera conformación), y un segundo nivel de unión a la diana en el estado no inhibido, no enmascarado y/o escindido (es decir, una segunda conformación), donde el segundo nivel de unión a la diana es mayor que el primer nivel de unión.

En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo no natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica de componentes naturales. En algunas realizaciones, un anticuerpo se produce de forma recombinante. En algunas realizaciones, un anticuerpo es producido por un hibridoma.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos, biparatópicos) formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluye uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por determinados fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (sin limitación): (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1} (p. ej., un anticuerpo digerido por papaína produce tres fragmentos: dos fragmentos Fab de unión al antígeno y un fragmento Fc que no se une al antígeno); (ii) un Fab de cadena sencilla (scFab), un fragmento que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}, en donde los dominios C_L y V_H están unidos mediante un péptido enlazador; (iii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra (p. ej., un anticuerpo digerido por pepsina produce dos fragmentos: un F(ab')₂ bivalente de unión al antígeno, y un fragmento pFc' que no se une al antígeno y su unidad monovalente F(ab') relacionada; (iv) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y C_{H1} (es decir, la parte de la cadena pesada que está incluida en el Fab); (v) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, y el F_v relacionado unido por disulfuro; (vi) un fragmento de dAb (anticuerpo de dominio) o sdAb (anticuerpo de dominio único) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio V_H; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; (viii) un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un fragmento que consiste en un dominio V_H y V_L, conectado por un péptido enlazador; y (ix) un anticuerpo tetravalente, que puede incluir varios formatos (estructuras) mediante los cuales el anticuerpo comprende 4 sitios de unión a antígeno.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos implicada en la unión y el reconocimiento muy específicos de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos que se dirigen a diferentes determinantes antigénicos. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca tanto anticuerpos monoclonales

intactos y de longitud completa así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, F_v), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos elaborados de diversas maneras, incluidas, pero no limitadas a, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de estas que contienen secuencias no humanas mínimas (p. ej., murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan restos de la región determinante de la complementariedad (CDR) por restos de la CDR de una especie no humana (p. ej., ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la capacidad, afinidad y especificidad deseadas (Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536, 1988).

En algunos casos, se reemplazan los restos de la región armazón (FR) F_v de una inmunoglobulina humana por los restos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Es posible modificar más el anticuerpo humanizado mediante la sustitución de restos adicionales en la región armazón F_v y/o en los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y típicamente, dos o tres dominios variables que contienen todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (F_c), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se describen ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados en las patentes de EE. UU. 5,225,539 y 5,639,641, Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):969-973, 1994; y Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996. En algunas realizaciones, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo de superficie remodelada. En algunas realizaciones, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo con injerto de CDR.

La expresión "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones armazón (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena son mantenidas juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., *J. Molec. Biol.* 273: 927-948, 1997). Además, se usan algunas veces en la técnica combinaciones de estos dos enfoques para determinar las CDR.

Generalmente se usa el sistema de numeración de Kabat cuando se refiere a un resto en el dominio variable (aproximadamente los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (p. ej., Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

La numeración de las posiciones de aminoácidos de Kabat se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Al usar este sistema de numeración, la secuencia de aminoácido lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento o una inserción en una FR o una CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (p. ej., restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de restos se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "estándar". Por el contrario, Chothia se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). Cuando se numera según el sistema de numeración de Kabat, el extremo del bucle CDR-H1 de Chothia varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle. Esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B, si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo 35A está presente, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle termina en 34. Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan en el software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H9S-H102	H95-H102	H95-H102

El índice EU o índice EU como en Kabat o esquema de numeración EU se refiere al sistema de numeración basado en el anticuerpo de IgG1 humana Eu de Edelman et al., 1969, *Proc Natl Acad Sci USA* 63:78-85.

- 5 La expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a un anticuerpo producido por un ser humano usando cualquier método conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humano no tiene secuencia no humana. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

10

La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable tanto de cadenas pesadas como ligeras corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (p. ej., ratón, rata, conejo, etc.) con la capacidad, afinidad y especificidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra (normalmente humana) para evitar o reducir la probabilidad de generar una respuesta inmunitaria en dicha especie (p. ej., ser humano). En ciertas realizaciones, el anticuerpo quimérico puede incluir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende al menos un polipéptido de cadena pesada y/o ligera humana, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana.

20

Los términos "epítipo" o "determinante antigénico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la parte de un antígeno que puede ser reconocida y unirse de forma específica a un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden estar formados tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se conservan tras la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de la proteína. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

25

- 30 "Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su pareja de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (K_d) o la concentración eficaz semi-máxima (EC_{50}). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para medir la afinidad de unión y cualquiera de ellos se puede utilizar a efectos de la presente invención. Se describen en el presente documento realizaciones ilustrativas específicas.

35

40

Por "se une específicamente" generalmente se entiende que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, por su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio, no relacionado. El término "especificidad" se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa mediante la cual determinado anticuerpo se une a cierto epítipo. Se puede considerar, por ejemplo, que el anticuerpo "A" tiene una mayor especificidad por un epítipo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una mayor especificidad que la que tiene por el epítipo "D" relacionado.

45

50

El término "inmunoconjugado", "conjugado" o "ADC" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión a células (p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo).

55

La expresión "anticuerpo modificado con cisteína" incluye un anticuerpo con al menos una Cys que

normalmente no está presente en un resto dado de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo. Tales Cys, que también se pueden mencionar como "Cys modificadas", se pueden modificar usando cualquier tecnología de biología molecular convencional o de ADN recombinante (p. ej., reemplazando la secuencia codificante de un resto que no es Cys en el resto diana por una secuencia codificante de Cys). Por ejemplo, si el resto original es Ser con una secuencia codificante de 5'-UCU-3', la secuencia codificante se puede mutar (p. ej., mediante mutagénesis dirigida al sitio) a 5'-UGU-3', la cual codifica Cys. En ciertas realizaciones, el anticuerpo modificado con Cys de la invención tiene una Cys modificada en la cadena pesada. En ciertas realizaciones, la Cys modificada se encuentra en o cerca del dominio CH3 de la cadena pesada. En ciertas realizaciones, la Cys modificada está en el resto 442 de la cadena pesada (numeración EU/OU). El resto C442 puede conjugarse con un fármaco/agente citotóxico a través del grupo tiol libre del resto C442, tal como haciéndolo reaccionar con un agente reactivo con tiol del fármaco citotóxico (p. ej., un grupo maleimido).

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos en la que una población de células se caracteriza por crecimiento celular no regulado. "Tumor" y "neoplasma" se refieren a una o más células que resultan del crecimiento o proliferación celular excesivos, sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) incluyendo lesiones precancerosas.

Ejemplos de cáncer incluyen cáncer de endometrio, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón no microcítico), cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer mielóide, melanoma y cáncer linfóide. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico, cáncer colorrectal, cáncer gástrico o cáncer de páncreas. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (células escamosas, células no escamosas, adenocarcinoma o carcinoma indiferenciado de células grandes), cáncer colorrectal (adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores del estroma gastrointestinal, linfoma colorrectal primario, leiomiomasarcoma, o carcinoma de células escamosas) o cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (TNBC)). En ciertas realizaciones, el cáncer es linfoma o leucemia. En ciertas realizaciones, los ejemplos de cánceres incluyen AML, CML, ALL (p. ej., B-ALL), CLL, síndrome mielodisplásico, leucemia de neoplasia DC plasmocitoide básica (BPDCN), linfomas de células B que incluyen linfomas no Hodgkin (NHL), linfoma/leucemia linfoblástica de células B precursoras y neoplasia de células B maduras, tales como leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluido el FL de grado bajo, intermedio y alto, linfoma de centro de folículo cutáneo, linfoma de células B de zona marginal (tipo MALT, tipo nodal y tipo esplénico), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de células B grandes difuso (DLBCL), linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postraspante, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL) y leucemia de Hodgkin (HL). En ciertas realizaciones, el cáncer es leucemia BPDCN. En ciertas realizaciones, el cáncer es ALL. En otras realizaciones, el cáncer es AML.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero) incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" se usan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un sujeto humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administre la composición. Dicha composición puede ser estéril.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento es una cantidad de un compuesto o composición suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. El efecto terapéutico completo puede no producirse necesariamente por la administración de una dosis, y puede producirse solo después de la administración de una serie de dosis. La "cantidad terapéuticamente eficaz" particular dependerá, p. ej., de la edad, el peso y la afección médica del sujeto, así como del método de administración y del agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se puede determinar de forma empírica y de manera rutinaria, en relación al propósito establecido.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "trata" o "tratamiento" incluye revertir, reducir o detener los síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección de una manera para mejorar o estabilizar la afección del sujeto. Como se usa en el presente documento, y como se entiende bien en la técnica, el "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, prevención, alivio, mejora o desaceleración de la progresión de uno o más síntomas o afecciones asociadas con una afección, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (parcial o total), ya

sea detectable o indetectable. "Tratamiento" puede significar también prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

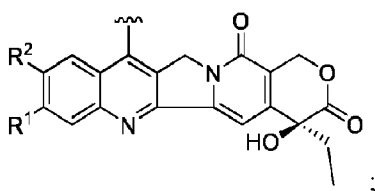
Compuestos

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

Z-L¹-D (Fórmula I)

en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:



R¹ es -F;

R² es metilo;

-L¹-Z es (i) -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶ o -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂; o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶;

cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo; y

cada R⁶ es independientemente -H, metilo o bencilo;

con la condición de que -L¹-Z no puede ser -CH₂OH.

En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂.

En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(CH₂)₂OH, -(CH₂)₃OH, -(CH₂)₄OH, -CH₂OMe, -(CH₂)₂OMe, -(CH₂)₃OMe, -(CH₂)₄OMe, -CH₂SH, -(CH₂)₂SH, -(CH₂)₃SH, -(CH₂)₄SH, -CH₂SMe, -(CH₂)₂SMe, -(CH₂)₃SMe, -(CH₂)₄SMe, -CH₂NH₂, -(CH₂)₂NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₄NH₂.

En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶. En algunas realizaciones, -L¹-Z es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶.

En algunas realizaciones, -L¹-Z es -CH₂NHC(=O)CH₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OH, -CH₂NHC(=O)CH₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OMe, -CH₂NHC(=O)CH₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SH, -CH₂NHC(=O)CH₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SMe, -CH₂SCH₂SH, -CH₂S(CH₂)₂SH, -CH₂S(CH₂)₃SH, -CH₂S(CH₂)₄SH, -CH₂S(CH₂)₅SH, -CH₂SCH₂SMe, -CH₂S(CH₂)₂SMe, -CH₂S(CH₂)₃SMe, -CH₂S(CH₂)₄SMe o -CH₂S(CH₂)₅SMe.

Cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁵ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es bencilo.

Cada R⁶ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁶ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁶ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁶ es bencilo.

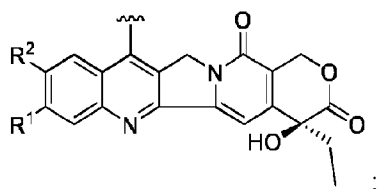
En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula II, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

5 E-A-Z'-L¹-D (Fórmula II)

en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:

10



R¹ es -F;

15 R² es metilo;

L¹-Z'-* es (i) -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-, o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸-, donde * es el sitio unido covalentemente a A;

20

cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo;

cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo;

25

A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

(i) -(alquilen C₁-C₆)-X⁵-Y³, en donde:

30

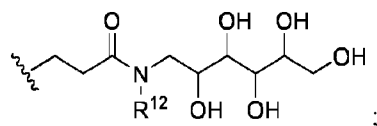
X⁵ es -NR¹²C(=O)- o -C(=O)NR¹²-;

Y³ es -alquilo C₁-C₁₀, donde Y³ está sustituido con 0-10 grupos OH; y

35

R¹² es -H, alquilo C₁-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, heteroarilo o bencilo; o

(ii)



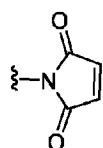
40

en donde R¹² es H o metilo;

E es -C(=O)-(alquilen C₁-C₁₀)-X³; y

45

X³ es



50

En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-.

En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1-$ es $-CH_2O-CH_2NH-$, $-(CH_2)_2O-CH_2NH-$, $-(CH_2)_3O-CH_2NH-$, $-(CH_2)_4O-CH_2NH-$, $-CH_2S-CH_2NH-$, $-(CH_2)_2S-CH_2NH-$, $-(CH_2)_3S-CH_2NH-$, $-(CH_2)_4S-CH_2NH-$, $-CH_2NH-$, $-(CH_2)_2NH-$, $-(CH_2)_3NH-$ o $-(CH_2)_4NH-$.

- 5 En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-O-CH_2-NR^8*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8*$, $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8*$, o $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^8*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-O-CH_2-NR^8*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-CH_2-NR^8*$. En algunas realizaciones, $-L^1-Z^1*$ es $-(\text{alquilen } C_1-C_5)-S-(\text{alquilen } C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^8*$.

En algunas realizaciones, -L¹-Z¹-* es -CH₂NHC(=O)CH₂O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)CH₂S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅S-CH₂-NH-*, -CH₂SCH₂S-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₂S-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₃S-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₄S-CH₂-NH-* o -CH₂S(CH₂)₅S-CH₂-NH-*.

- 20 Cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁵ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es bencilo. Cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁸ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es bencilo.

- 25 En las diversas realizaciones que describen -L¹-Z'-* en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a A.

En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, cada aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido D.

- En algunas realizaciones, A es $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$, donde * es el sitio unido covalentemente a E; AA¹ y AA² son cada uno independientemente un resto de aminoácido; y a1 es un número entero de 1 a 9.

- 35 En algunas realizaciones, -AA¹-(AA²)_{a1}* es -Gly-Gly-Gly*, -Ala-Val*, -Val-Ala*, -Val-Cit*, -Val-Lys*, -Lys-Val*, -Phe-Lys*, -Lys-Phe*, -Lys-Lys*, -Ala-Lys*, -Lys-Ala*, -Phe-Cit*, -Cit-Phe*, -Leu-Cit*, -Cit-Leu*, -Ile-Cit*, -Phe-Ala*, -Ala-Phe*, -Phe-N⁹-tosil-Arg*, -N⁹-tosil-Arg-Phe*, -Phe-N⁹-nitro-Arg*, -N⁹-nitro-Arg-Phe*, -Phe-Phe-Lys*, -Lys-Phe-Phe*, -Gly-Phe-Lys*, Lys-Phe-Gly*, -Leu-Ala-Leu*, -Ile-Ala-Leu*, -Leu-Ala-Ile*, -Val-Ala-Val*, -Ala-Leu-Ala-Leu*, -Leu-Ala-Leu-Ala*, -β-Ala-Leu-Ala-Leu*, -Gly-Phe-Leu-Gly*, -Gly-Leu-Phe-
40 Gly*, -Val-Arg*, -Arg-Val*, -Arg-Arg*, -Ala-Ala*, -Ala-Met*, -Met-Ala*, -Thr-Thr*, -Thr-Met*, -Met-Thr*, -Leu-Ala*, -Ala-Leu*, -Cit-Val*, -Gln-Val*, -Val-Gln*, -Ser-Val*, -Val-Ser*, -Ser-Ala*, -Ser-Gly*, -Ala-Ser*, -Gly-Ser*, -Leu-Gln*, -Gln-Leu*, -Phe-Arg*, -Arg-Phe*, -Tyr-Arg*, -Arg-Tyr*, -Phe-Gln*, -Gln-Phe*, -Val-Thr*, -Thr-Val*, -Met-Tyr* y -Tyr-Met*.

- 45 En algunas realizaciones, -AA¹-(AA²)_a1-* es -Val-D-Lys-*, -Val-D-Arg-*, -L-Val-Cit-*, -L-Val-Lys-*, -L-Val-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Phe-Phe-Lys-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -Ala-D-Ala-*, -Val-D-Cit-*, -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Gln-L-Val-*, -L-Gln-L-Leu-* o -L-Ser-L-Val*.

En algunas realizaciones, -AA¹-(AA²)_{a1}-* es: -Ala-Ala-*, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gln-Leu-*, -Leu-Gln-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Ala-Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Ala-Gly-*, -Gly-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Gly-Gly-* o -Gly-Gly-Phe-Gly-*.

- En algunas realizaciones, -AA¹-(AA²)_{a1}-* es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-L-Ala-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Gln-L-Leu-*, -L-Gln-D-Leu-*, -L-Leu-L-Gln-*, -L-Leu-D-Gln-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -Gly-L-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Ala-Gly-*, -Gly-D-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Ala-Gly-*, -Gly-L-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Val-Gly-*, -Gly-D-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Val-Gly-*, -Gly-L-Phe-Gly-Gly-*, o Gly-Gly-L-Phe-Gly-*

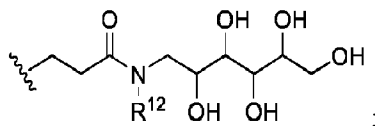
- 60 En algunas realizaciones, $-AA^1-(AA^2)_{a1}-^*$ es: $-L-Ala-L-Ala-^*$, $-L-Ala-D-Ala-LAla-^*$, $-L-Ala-L-Ala-L-Ala-^*$ o $-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-^*$.

En las diversas realizaciones que describen $AA^1-(AA^2)_{a1}-*$ en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a E.

- 65 En algunas realizaciones, A está sustituido con uno o más polioles, que son -(alquilen C₁-C₆)-X⁵-Y³, en donde:

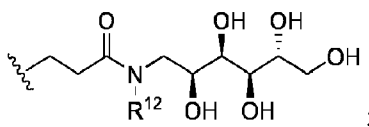
X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}-$; Y^3 es -alquilo C_1-C_{10} , donde Y^3 está sustituido con 0-10 grupos OH; y R^{12} es -H, alquilo C_1-C_6 , fluoroalquilo C_1-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , arilo, heteroarilo o bencilo.

5 En algunas realizaciones, en donde el poliol es



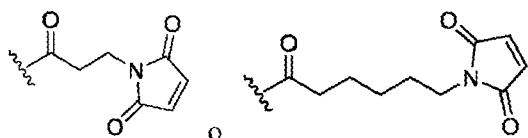
en donde R^{12} es H o metilo.

10 En algunas realizaciones, en donde el poliol es



en donde R^{12} es H o metilo.

15 E es $-C(=O)-(alquilen\ C_1-C_{10})-X^3$. En algunas realizaciones, E es

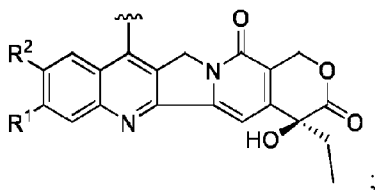


20 En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de Fórmula III, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

CBA-E'-A-Z'-L¹-D (Fórmula III)

25 en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:



30 R^1 es -F;

R^2 es metilo;

35 $-L^1-Z'^{*}$ es (i) $-(alquilen\ C_1-C_4)-O-CH_2-NR^{8-*}$, $-(alquilen\ C_1-C_4)-S-CH_2-NR^{8-*}$ o $-(alquilen\ C_1-C_4)-NR^{8-*}$, o (ii) $-(alquilen\ C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(alquilen\ C_1-C_5)-O-CH_2-NR^{8-*}$, $-(alquilen\ C_1-C_5)-NR^5C(=O)-(alquilen\ C_1-C_5)-S-CH_2-NR^{8-*}$, $-(alquilen\ C_1-C_5)-S-(alquilen\ C_1-C_5)-S-CH_2-NR^{8-*}$ o $-(alquilen\ C_1-C_5)-S-(alquilen\ C_1-C_5)-SS-CH_2-NR^{8-*}$, donde $*$ es el sitio unido covalentemente a A;

40 cada R^5 es independientemente -H, metilo o bencilo;

cada R^8 es independientemente -H, metilo o bencilo;

45 A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

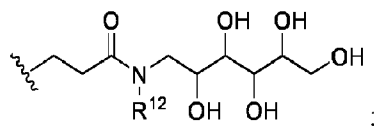
(i) $-(alquilen\ C_1-C_6)-X^5-Y^3$, en donde:

X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}-$;

Y³ es -alquilo C₁-C₁₀, donde Y³ está sustituido con 0-10 grupos OH; y

R¹² es -H, alquilo C₁-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, heteroarilo o bencilo; o

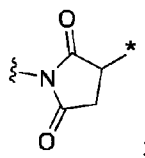
(ii)



en donde R¹² es H o metilo;

E' es -C(=O)-(alquilen C₁-C₁₀)-X⁶-*, donde * es el sitio unido covalentemente a CBA;

X⁶ es



donde * es el sitio unido covalentemente a CBA;; y

CBA es un agente de unión a células, en donde el agente de unión a células es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-.

En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -CH₂O-CH₂NH-*, -(CH₂)₂O-CH₂NH-*, -(CH₂)₃O-CH₂NH-*, -(CH₂)₄O-CH₂NH-*, -CH₂S-CH₂NH-*, -(CH₂)₂S-CH₂NH-*, -(CH₂)₃S-CH₂NH-*, -(CH₂)₄S-CH₂NH-*, -CH₂NH-*, -(CH₂)₂NH-*, -(CH₂)₃NH-* o -(CH₂)₄NH-.

En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-. En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸-.

En algunas realizaciones, -L¹-Z'-* es -CH₂NHC(=O)CH₂O-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂O-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃O-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄O-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅O-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)CH₂S-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂S-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃S-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄S-CH₂NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅S-CH₂NH-*, -CH₂SCH₂S-CH₂NH-*, -CH₂S(CH₂)₂S-CH₂NH-*, -CH₂S(CH₂)₃S-CH₂NH-*, -CH₂S(CH₂)₄S-CH₂NH-* o -CH₂S(CH₂)₅S-CH₂NH-.

Cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁵ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁵ es bencilo. Cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es independientemente -H. En algunas realizaciones, cada R⁸ es metilo. En algunas realizaciones, cada R⁸ es bencilo.

En las diversas realizaciones que describen -L¹-Z'-* en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a A.

En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 8 aminoácidos. En algunas realizaciones, A es un péptido que comprende de 2 a 4 aminoácidos. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, cada aminoácido en dicho péptido es un aminoácido L. En algunas realizaciones, al menos un aminoácido en dicho péptido es un aminoácido D.

En algunas realizaciones, A es $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$, donde * es el punto de unión a E', AA^1 y AA^2 son cada uno independientemente un resto de aminoácido; y $a1$ es un número entero de 1-9.

En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es -Gly-Gly-Gly-*, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Val-Cit-*, -Val-Lys-*, -Lys-Val-*, -Phe-Lys-*, -Lys-Phe-*, -Lys-Lys-*, -Ala-Lys-*, -Lys-Ala-*, -Phe-Cit-*, -Cit-Phe-*, -Leu-Cit-*, -Cit-Leu-*, -Ile-Cit-*, -Phe-Ala-*, -Ala-Phe-*, -Phe-N⁹-tosil-Arg-*, -N⁹-tosil-Arg-Phe-*, -Phe-N⁹-nitro-Arg-*, -N⁹-nitro-Arg-Phe-*, -Phe-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Phe-*, -Gly-Phe-Lys-*, -Lys-Phe-Gly-*, -Leu-Ala-Leu-*, -Ile-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Ile-*, -Val-Ala-Leu-*, -Ala-Leu-Ala-Leu-*, -Leu-Ala-Leu-Ala-*, -β-Ala-Leu-Ala-Leu-*, -Gly-Phe-Leu-Gly-*, -Gly-Leu-Phe-Gly-*, -Val-Arg-*, -Arg-Val-*, -Arg-Arg-*, -Ala-Ala-*, -Ala-Met-*, -Met-Ala-*, -Thr-Thr-*, -Thr-Met-*, -Met-Thr-*, -Leu-Ala-*, -Ala-Leu-*, -Cit-Val-*, -Gln-Val-*, -Val-Gln-*, -Ser-Val-*, -Val-Ser-*, -Ser-Ala-*, -Ser-Gly-*, -Ala-Ser-*, -Gly-Ser-*, -Leu-Gln-*, -Gln-Leu-*, -Phe-Arg-*, -Arg-Phe-*, -Tyr-Arg-*, -Arg-Tyr-*, -Phe-Gln-*, -Gln-Phe-*, -Val-Thr-*, -Thr-Val-*, -Met-Tyr-* y -Tyr-Met-*.

En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es -Val-D-Lys-*, -Val-D-Arg-*, -L-Val-Cit-*, -L-Val-Lys-*, -L-Val-Arg-*, -L-Val-D-Cit-*, -L-Phe-Phe-Lys-*, -L-Val-D-Lys-*, -L-Val-D-Arg-*, -L-Arg-D-Arg-*, -L-Ala-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -Ala-D-Ala-*, -Val-D-Cit-*, -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Gln-L-Val-*, -L-Gln-L-Leu-* o -L-Ser-L-Val-*.

En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -Ala-Ala-*, -Ala-Val-*, -Val-Ala-*, -Gln-Leu-*, -Leu-Gln-*, -Ala-Ala-Ala-*, -Ala-Ala-Ala-Ala-*, -Gly-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Ala-Gly-*, -Gly-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-Val-Gly-*, -Gly-Phe-Gly-Gly-* o -Gly-Gly-Phe-Gly-*.

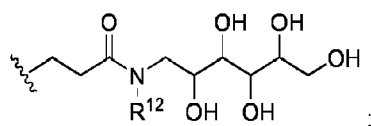
En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Val-*, -L-Ala-D-Val-*, -L-Val-L-Ala-*, -L-Val-D-Ala-*, -L-Gln-L-Leu-*, -L-Gln-D-Leu-*, -L-Leu-L-Gln-*, -L-Leu-D-Gln-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-D-Ala-*, -Gly-L-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Ala-Gly-*, -Gly-D-Ala-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Ala-Gly-*, -Gly-L-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-L-Val-Gly-*, -Gly-D-Val-Gly-Gly-*, -Gly-Gly-D-Val-Gly-*, -Gly-L-Phe-Gly-Gly-* o -Gly-Gly-L-Phe-Gly-*.

En algunas realizaciones, $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ es: -L-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-D-Ala-L-Ala-*, -L-Ala-L-Ala-L-Ala-* o -L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-*.

En las diversas realizaciones que describen $-(AA^1)-(AA^2)_{a1}-*$ en el presente documento, * es el sitio unido covalentemente a E'.

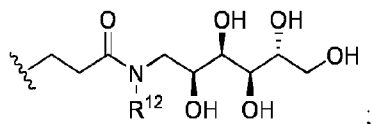
En algunas realizaciones, A está sustituido con uno o más polioles, que son $-(alquilen\ C_1-C_6)-X^5-Y^3$; en donde: X^5 es $-NR^{12}C(=O)-$ o $-C(=O)NR^{12}$; Y^3 es $-alquilo\ C_1-C_{10}$, donde Y^3 está sustituido con 0-10 grupos OH; y R^{12} es $-H$, $alquilo\ C_1-C_6$, $fluoroalquilo\ C_1-C_6$, $cicloalquilo\ C_3-C_6$, $arilo$, $heteroarilo$ o $bencilo$.

En algunas realizaciones, el poliol es



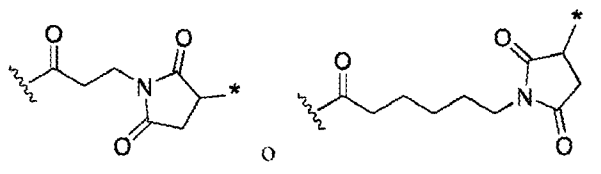
en donde R^{12} es H o metilo.

En algunas realizaciones, en donde el poliol es



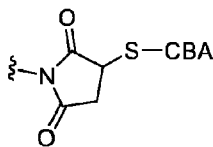
en donde R^{12} es H o metilo.

En algunas realizaciones, E' es $-C(=O)-(alquilen\ C_1-C_{10})-X^6-*$. En algunas realizaciones, E' es



donde * es el sitio unido covalentemente a CBA.

- 5 En algunas realizaciones, el CBA comprende un grupo -SH que se une covalentemente con E' para proporcionar



- 10 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula I y es uno cualquiera de los siguientes compuestos de la siguiente tabla:

Tabla 1A.

Compuesto n.º	Estructura
7a	
6a	
d	
6c	
8a	

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula I y es un compuesto de uno cualquiera de los siguientes de la siguiente tabla:

Tabla. 1B

Compuesto n.º	Estructura
f	

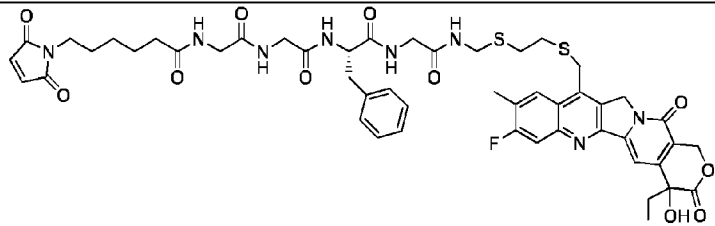
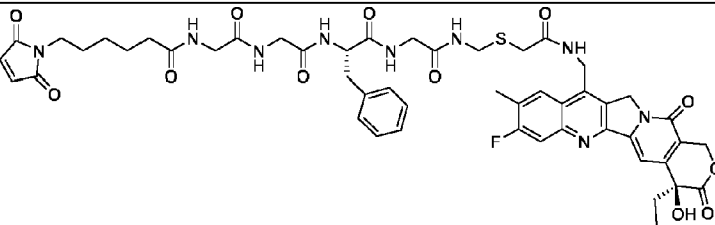
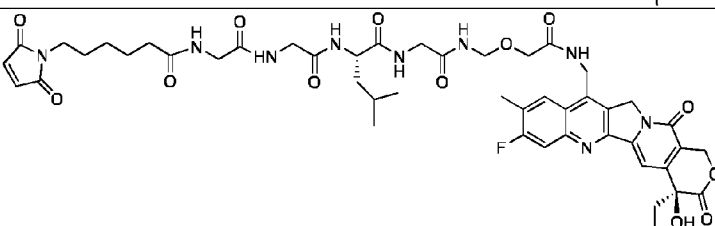
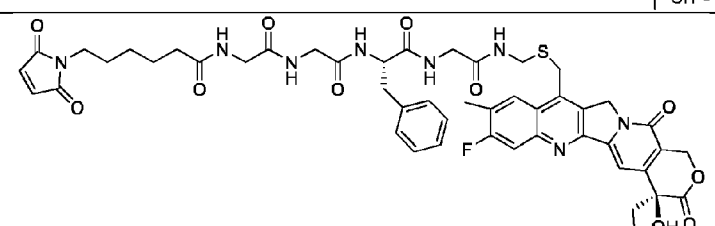
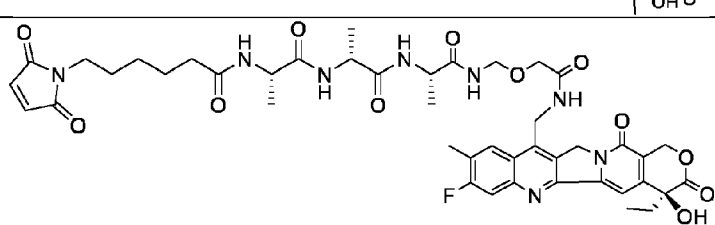
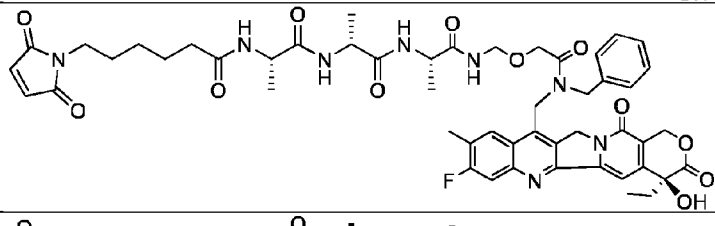
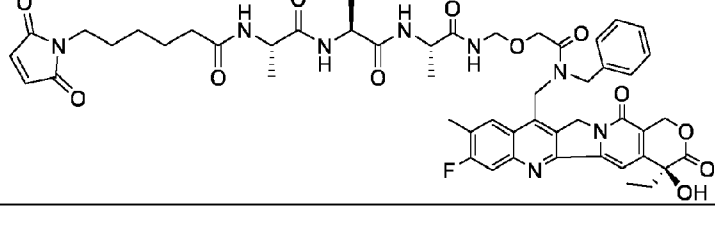
Compuesto n.º	Estructura
35a	
h	
i	
j	
8p	
7c	
k	
8e	

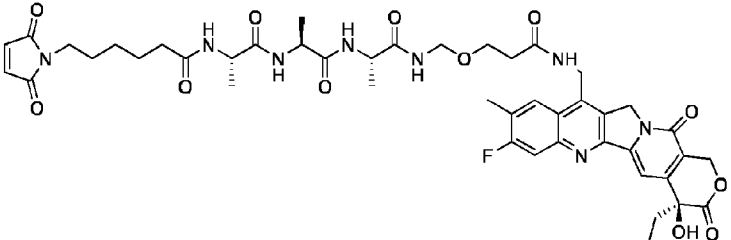
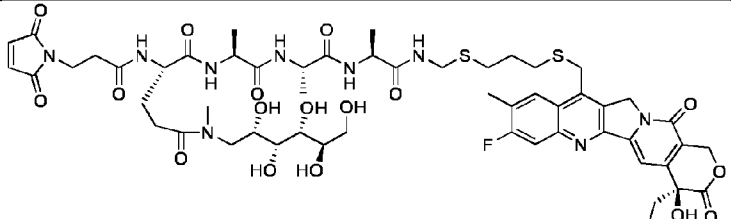
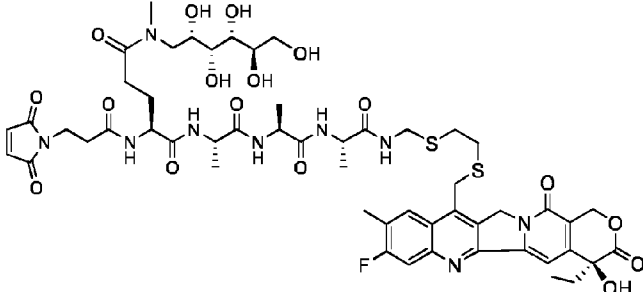
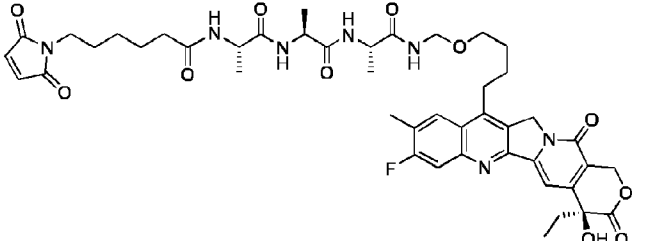
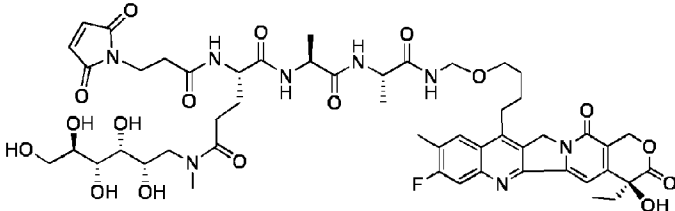
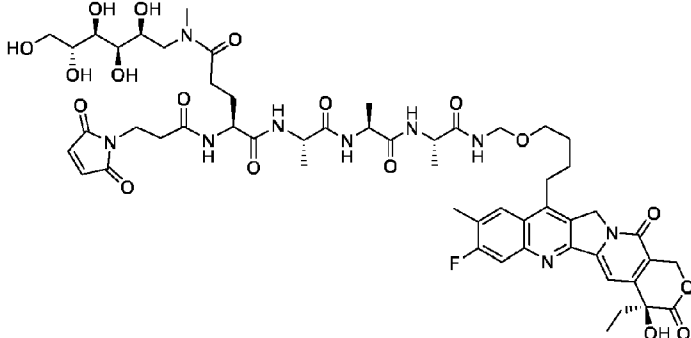
Compuesto n.º	Estructura
33a	

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de Fórmula II y es un compuesto de uno cualquiera de los siguientes de la siguiente tabla:

5 Tabla. 2

Compuesto n.º	Estructura
q	
25b	
25a	
s	
t	
22a	

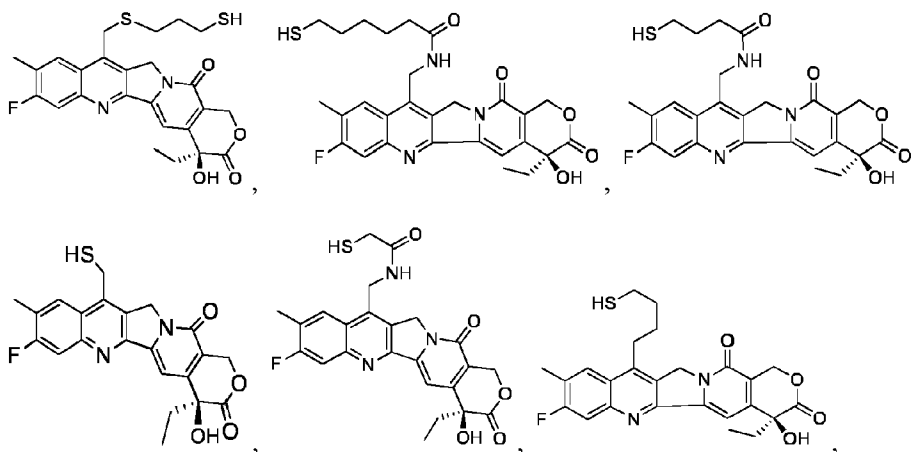
Compuesto n.º	Estructura
u	
v	
w	
x	
22c	
22d	
22b	

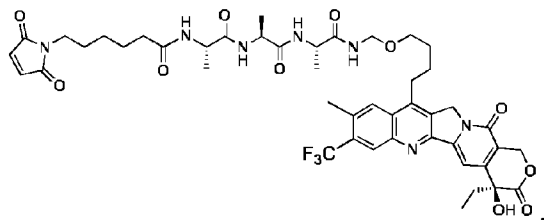
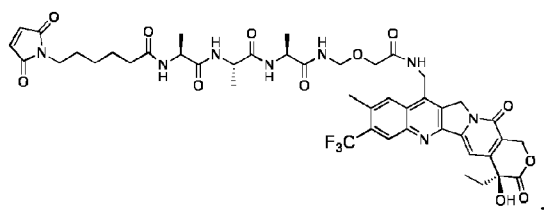
Compuesto n.º	Estructura
ad	
32a	
32b	
28a	
28c	
28b	

Compuesto n.º	Estructura
ag	
aj	
ak	
al	

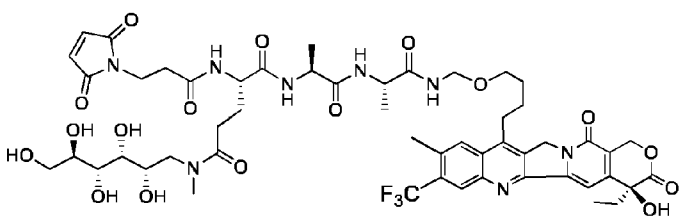
En algunas realizaciones, donde el compuesto comprende un sulfóxido y el sulfóxido es de configuración R o S.

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto es uno cualquiera de los siguientes:





5 o



Síntesis de compuestos

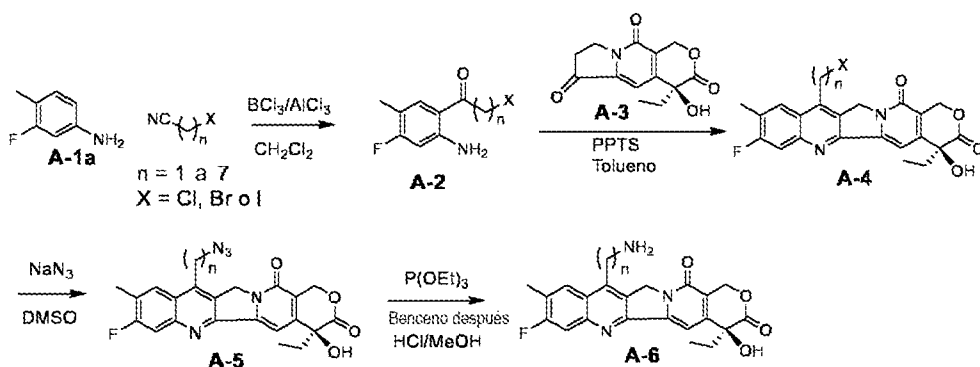
10

Los compuestos descritos en el presente documento se preparan por las rutas sintéticas generales descritas en los siguientes esquemas.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar como se indica en el Esquema 1.

15

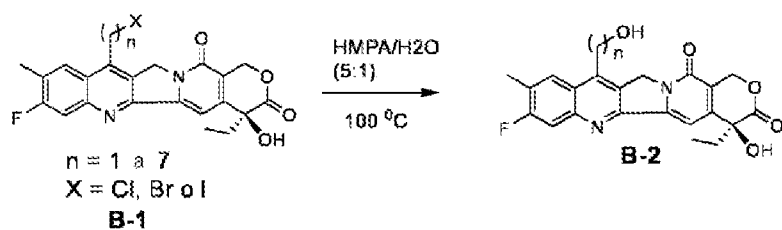
Esquema 1. Esquema sintético general para preparar compuestos RNH₂ (A-6)



20

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar como se indica en el Esquema 2.

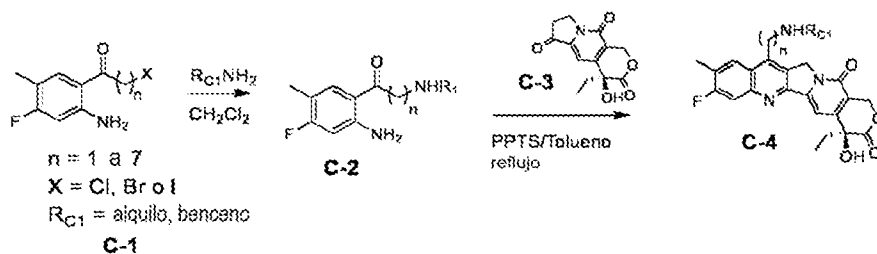
Esquema 2. Esquema sintético general para preparar compuestos ROH (B-2)



25

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar como se indica en el Esquema 3.

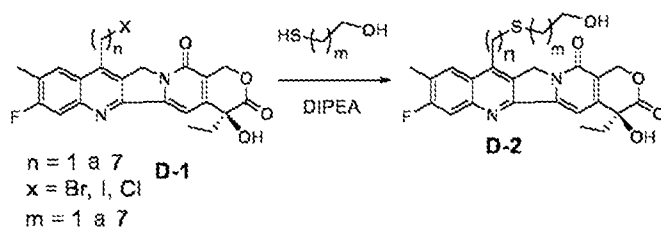
Esquema 3. Esquema sintético general para preparar compuestos $RNHR_{C1}$ (C-4)



5

Como se describe en el presente documento pero no es parte de la invención reivindicada, la preparación de compuestos es según el Esquema 4.

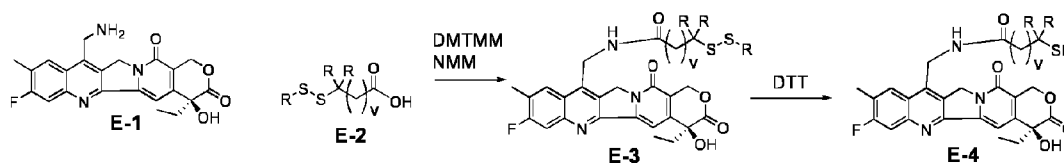
10 Esquema 4. Esquema sintético general para preparar compuestos $RS(CH_2)_nOH$ (D-2)



Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar como se indica en el Esquema 5.

15

Esquema 5. Métodos general para preparar el derivado de camptotecina que lleva tiol (E-4)



20

v puede ser de 1 a 4. En algunas realizaciones, R puede ser alquilo, arilo o heteroarilo. R puede ser metilo, etilo, fenilo o piridilo.

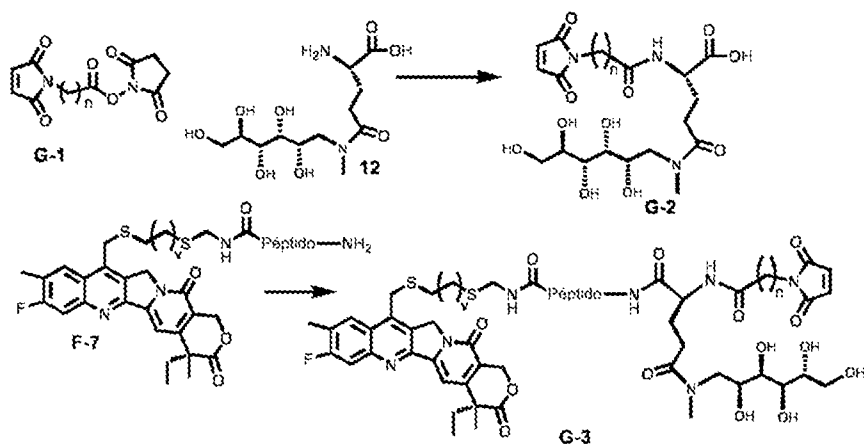
Los compuestos descritos en el presente documento se pueden preparar como se indica en el Esquema 6.

25

Esquema 6. Método general para preparar uniones tioaminal-péptido que se pueden derivatizar adicionalmente para incorporar tioles o maleimidas

5

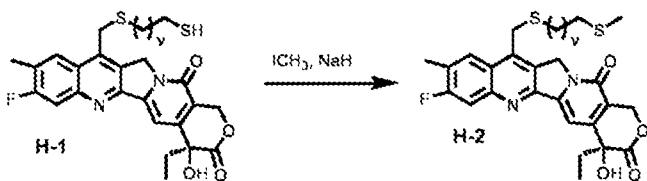
Esquema 7.



10

15

Esquema 8.



v puede ser de 1 a 10. v puede ser de 1 a 5.

5 Agentes de unión a células

Los agentes de unión a células en los inmunoconjugados de la presente invención pueden ser de cualquier tipo actualmente conocido, o que se hagan conocidos, y pueden ser anticuerpos (tales como anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, especialmente anticuerpos monoclonales) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, procuerpos, o nanocuerpos.

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla, un fragmento de anticuerpo monoclonal (o "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno") que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico (o "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno") que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio (p. ej., sdAb), o un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana.

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humanizado de cadena sencilla o un fragmento de anticuerpo humanizado (o "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno").

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo de superficie remodelada, un anticuerpo de cadena sencilla de superficie remodelada o un fragmento de anticuerpo de superficie remodelada (o "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno").

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo (incluidos derivados de anticuerpos), el CBA puede unirse a un ligando en la célula diana, tal como un ligando de la superficie celular, incluidos receptores de la superficie celular.

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células (CBA) se une a células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunitarias, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o melanocitos. En algunas realizaciones, el CBA se une a células que expresan uno cualquiera o más de los antígenos 5T4, ADAM-9, ALK, AMHR11, ASCT2, Axl, B7-H3, BCMA, C4,4a, CA6, CA9, CanAg, CD123, CD138, CD142, CD166, CD184, CD19, CD20, CD205, CD22, CD248, CD25, CD3, CD30, CD33, CD352, CD37, CD38, CD40L, CD44v6, CD45, CD46, CD48, CD51, CD56, CD7, CD70, CD71, CD74, CD79b, CDH6, CEACAM5, CEACAM6, cKIT, CLDN18.2, CLDN6, CLL-1, c-MET, Cripto, CSP-1, CXCR5, DLK-1, DLL3, DPEP3, disadherina, EFNA4, EGFR, EGFRviii, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, ETBR, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR-alfa, FSH, GCC, GD2, GD3, Globo H, GPC-1, GPC3, gpNMB, HER-2, HER-3, HLA-DR, HSP90, IGF-1R, IL-13R, IL1RAP, IL7R, receptor de interleuquina-4 (IL4R), KAAG-1, LAMP-1, antígeno Y de Lewis, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH, LIV-1, LRP-1, LRRC15, Ly6E, MAGE, Mesotelina (MSLN), MET, proteína A y B relacionada con la cadena de MHC de clase I (MICA y MICB), MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, NOTCH3, OAcGD2, OX001L, p-Cadherina, PD-L1, fosfatidilserina (PS), mucina epitelial polimórfica (PEM), receptor de prolactina (PRLR), PSMA, PTK7, RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SSTR2, STEAP-1, STING, STn, TIM-1, TM4SF1, TNF-alfa, TRA, TROP-2, glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), epítipo de mucina-1 específico de tumor (TA-MUC1), CD5, TIM-3, UPK2 o UPK1b.

En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un anticuerpo modificado con cisteína o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a células que expresan uno o más de los antígenos 5T4, ADAM-9, ALK, AMHR11, ASCT2, Axl, B7-H3, BCMA, C4,4a, CA6, CA9, CanAg, CD123, CD138, CD142, CD166, CD184, CD19, CD20, CD205, CD22, CD248, CD25, CD3, CD30, CD33, CD352, CD37, CD38, CD40L, CD44v6, CD45, CD46, CD48, CD51, CD56, CD7, CD70, CD71, CD74, CD79b, CDH6, CEACAM5, CEACAM6, cKIT, CLDN18.2, CLDN6, CLL-1, c-MET, Cripto, CSP-1, CXCR5, DLK-1, DLL3, DPEP3, disadherina, EFNA4, EGFR, EGFRviii, ENPP3, EpCAM, EphA2, EphA3, ETBR, FGFR2, FGFR3, FLT3, FOLR-alfa, FSH, GCC, GD2, GD3, Globo H, GPC-1, GPC3, gpNMB, HER-2, HER-3, HLA-DR, HSP90, IGF-1R, IL-13R, IL1RAP, IL7R, receptor de interleuquina-4 (IL4R), KAAG-1, LAMP-1, antígeno Y de Lewis, LGALS3BP, LGR5, LH/hCG, LHRH,

LIV-1, LRP-1, LRRC15, Ly6E, MAGE, Mesotelina (MSLN), MET, proteína A y B relacionada con la cadena de MHC de clase I (MICA y MICB), MT1-MMP, MTX3, MTX5, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, NOTCH3, OAcGD2, OX001L, p-Cadherina, PD-L1, fosfatidilserina (PS), mucina epitelial polimórfica (PEM), receptor de prolactina (PRLR), PSMA, PTK7, RNF43, ROR1, ROR2, SAIL, SLAMF7, SLC44A4, SLITRK6, SSTR2, STEAP-1, STING, STn, TIM-1, TM4SF1, TNF-alfa, TRA, TROP-2, glicoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), epítipo de mucina-1 específico de tumor (TA-MUC1), CD5, TIM-3, UPK2 o UPK1b.

En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CD37 (p. ej., como se describe en el documento USPN 8,765,917), un anticuerpo anti-CD19 (p. ej., el anticuerpo huB4 como se describe en el documento USPN 9,555,126), y un anticuerpo anti-EGFR (p. ej., el anticuerpo huML66 como se describe en los documentos USPN 9,238,690 8,790,649 y 9,125,896).

En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-CD 123 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que puede comprender: a) al menos una región variable de cadena ligera o un fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3}, respectivamente, en donde CDR_{L1} tiene la secuencia de aminoácidos de RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 1), CDR_{L2} tiene la secuencia de aminoácidos de RVNRLVD (SEQ ID NO: 2), y CDR_{L3} tiene la secuencia de aminoácidos de LQYDAFPYT (SEQ ID NO: 3); y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3}, respectivamente, en donde CDR_{H1} tiene la secuencia de aminoácidos de SSIMH (SEQ ID NO: 4), CDR_{H2} tiene la secuencia de aminoácidos de YIKPYNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO: 5) y CDR_{H3} tiene la secuencia de aminoácidos de EGGNDYYDTNMY (SEQ ID NO: 6).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD123 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYND
GTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGNDYYDTMDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;

y una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIRVNRLVDG
VPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 9), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD123 tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa de

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYND
GTYNEKFKGRATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGNDYYDTMDY
WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO: 8), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;

y una secuencia de longitud completa de cadena ligera de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQKPGKAPKTLIRVNRLVDG
VPSRFSGSGSGNDYTL TISSLPEDF ATYYCLQYDAFPYTFGQGTKVEIKRTV AAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST
YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} están subrayadas

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD123 o fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a anticuerpo activable como se describe adicionalmente a continuación. En ciertas otras realizaciones, el anticuerpo activable anti-CD123 o el fragmento de anticuerpo de unión al anticuerpo de CD123 activable se pueden conjugar con un compuesto de Fórmula I.

En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-CD33 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en las patentes de EE. UU. N.º 7,342,110 y 7,557,189.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede

- comprender: a) al menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3}, respectivamente, en donde CDR_{L1} tiene la secuencia de aminoácidos de KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEQ ID NO: 11), CDR_{L2} tiene la secuencia de aminoácidos de WASTRES (SEQ ID NO: 12) y CDR_{L3} tiene la secuencia de aminoácidos de HQYLSSRT (SEQ ID NO: 13); y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3}, respectivamente, en donde CDR_{H1} tiene la secuencia de aminoácidos de SYYIH (SEQ ID NO: 14), CDR_{H2} tiene la secuencia de aminoácidos de VIYPGNDDISYNQKFQG (SEQ ID NO: 15), y CDR_{H3} tiene la secuencia de aminoácidos de EVRLRYFDV (SEQ ID NO: 16).
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos de
- QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGN
DDTSYNQKFQGGKATETADKSSTTAYMQLSSETSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGO GTT_{TVSS} (SEQ ID NO: 17), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;
- y una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de
- EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA_{WYQQIPGQSPRLLIYWA}
STRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQPEDLAIIYCHQYLSSRTFGOGTKLEIKR (SEQ ID NO: 19), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa de
- QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGN
DDISYNQKFQGGKATLTADKSSTTAYMQLSSETSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGO
GTT_{TVSS}ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 18), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;
- y una secuencia de longitud completa de cadena ligera de
- EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLA_{WYQQIPGQSPRLLIYWA}
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTTTHSSVOPFDEATYYCHQYLSSRTFGQGKTFIKRTV
AAPS_{VFI}PPSDEQLKSGTASV_{VCL}LN_{NFY}PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es el anticuerpo huMy9-6.
- En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a anticuerpo activable como se describe adicionalmente a continuación. En determinadas otras realizaciones, el anticuerpo activable anti-CD33 o el fragmento de anticuerpo de unión al anticuerpo de CD33 activable se pueden conjugar con un compuesto de Fórmula I.
- En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-ADAM9 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el documento WO2018/119196 y en las solicitudes provisionales de EE. UU. N.º 62/690052 y 62/691342.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ADAM9 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo anti-ADAM9 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a ADAM9 humano y ADAM9 cyno.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ADAM9 humanizado o el fragmento de unión a ADAM9 del mismo está optimizado para tener al menos una mejora de 100 veces en la afinidad de unión a ADAM9 cyno y conserva una alta afinidad de unión a ADAM9 humano en comparación con el anticuerpo parental quimérico o murino.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ADAM9 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., el anticuerpo anti-ADAM9 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo) comprende: a) al menos una

- región variable de cadena ligera o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedades (CDR) secuenciales CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3}, respectivamente, en donde CDR_{L1} tiene la secuencia de aminoácidos de KASQSVSDYSGDSYMN (SEQ ID NO: 21), CDR_{L2} tiene la secuencia de aminoácidos de AASDLES (SEQ ID NO: 22) y CDR_{L3} tiene la secuencia de aminoácidos de QQSHEDPFT (SEQ ID NO: 23); y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3}, respectivamente, en donde, CDR_{H1} tiene la secuencia de aminoácidos de SYWMH (SEQ ID NO: 24), CDR_{H2} tiene la secuencia de aminoácidos de EIPIFGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 25), y, CDR_{H3} tiene la secuencia de aminoácidos de GGYYYYPRQGFLDY (SEQ ID NO: 26).
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ADAM9 o fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., el anticuerpo anti-ADAM9 humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo) comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de amino de
- EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE EIPIFGHTNY NEKEKSRFTISLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG YYYPRQGFL DYWGQGTITV VSS (SEQ ID NO: 27), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;
- y una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de
- DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVSDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS DLES GIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFATYYCQQSHEDPFTFGGQGTKLEI K (SEQ ID NO: 28), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-ADAM9 tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa de
- EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE EIPIFGHTNY NEKFKSRFTISLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG YYYPRQGFL DYWGQGTITV VSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLYIT REPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKQSLCLS PG (SEQ ID NO: 29), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;
- y una secuencia de longitud completa de cadena ligera de
- DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVSDYSGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS DLESGIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFATYYCQQSHEDPFTFGGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 30); en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.
- En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-ADAM9 o fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a anticuerpo activable como se describe adicionalmente a continuación. En determinadas otras realizaciones, el anticuerpo activable anti-ADAM9 o el fragmento de anticuerpo de unión al anticuerpo de ADAM9 activable se pueden conjugar con un compuesto de Fórmula I.
- En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-receptor de folato (es decir, FOLR1 o FRα) (p. ej., como se describe en la patente de EE. UU. 8,709,432, patente de EE. UU. N.º 8,557,966 y documento WO2011106528).
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender:
- a) al menos una región variable de cadena ligera o fragmento del mismo que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3}, respectivamente, en donde CDR_{L1} tiene la secuencia de aminoácidos de KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 31), CDR_{L2} tiene la secuencia de aminoácidos de RASNLEA (SEQ ID NO: 32), y, CDR_{L3} tiene la secuencia de aminoácidos de QQSREYPYT (SEQ ID NO: 33); y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3}, respectivamente, en donde, CDR_{H1} tiene la secuencia de aminoácidos de GYFMN (SEQ ID NO: 34) o GYTFTGYFMN (SEQ ID NO: 37), CDR_{H2} tiene la secuencia de aminoácidos de RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 35) o RIHPYDGDTF (SEQ ID NO: 38), y CDR_{H3} tiene la secuencia de aminoácidos de YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 36). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα o su fragmento de unión a antígeno comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDR_{L1} que tiene una

5 secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 31, una CDR_{L2} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32, y una CDR_{L3} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33; y b) una región variable de cadena pesada que comprende una CDR_{H1} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34, una CDR_{H2} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 35 y una CDR_{H3} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα o su fragmento de unión a antígeno comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende una CDR_{L1} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 31, una CDR_{L2} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 32, y una CDR_{L3} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 33; y b) una región variable de

10 cadena pesada que comprende una CDR_{H1} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 37, una CDR_{H2} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 38 y una CDR_{H3} que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 36.

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα o su fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos de

20 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWWKQSPGQSLEWIGRIHPYD
GDTFYNQKFQGGKATLTVDKSSNTAHMELLSTLSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 39), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;

y una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de

25 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHYHQKPGQGPRLLIYRASN
LEAGVPDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQGSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 40), o

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHYHQKPGQGPRLLIYRASN
LEAGVPDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQGSREYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 41), en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa de

35 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWWKQSPGQSLEWIGRIHPYD
GDTFYNQKFQGGKATLTVDKSSNTAHMELLSTLSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWG
QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
40 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42), en donde CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} tienen doble subrayado;

y una secuencia de longitud completa de cadena ligera de

45 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHYHQKPGQGPRLLIYRASN
LEAGVPDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQGSREYPYTFGGGKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 43), o

50 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAAGTSLMHYHQKPGQGPRLLIYRASN
LEAGVPDRFSGSGSKTDFLTNISPVEAEDAATYYCQGSREYPYTFGGGKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 44); en donde CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3} tienen doble subrayado.

55 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-FRα es el anticuerpo huMov19 o M9346A.

60 En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-FRα o fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a anticuerpo activable como se describe adicionalmente a continuación. En determinadas otras realizaciones, el anticuerpo activable anti-FRα o el fragmento de anticuerpo de unión al anticuerpo de FRα activable se pueden conjugar con un compuesto de Fórmula I.

65 En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-EpCAM o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EpCAM o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender: a) al menos una región variable de cadena ligera o fragmento de la misma que comprende tres

regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_L1, CDR_L2 y CDR_L3, respectivamente, en donde CDR_L1 tiene la secuencia de aminoácidos de RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45), CDR_L2 tiene la secuencia de aminoácidos de QTSNLAS (SEQ ID NO: 46) y CDR_L3 tiene la secuencia de aminoácidos de AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47); y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_H1, CDR_H2 y CDR_H3, respectivamente, en donde CDR_H1 tiene la secuencia de aminoácidos de NYIIH (SEQ ID NO: 48), CDR_H2 tiene la secuencia de aminoácidos de WIYPGNVYIYNEKFKG (SEQ ID NO: 49), y CDR_H3 tiene la secuencia de aminoácidos de DGPWFAY (SEQ ID NO: 50).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EpCAM o su fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que tiene la secuencia de aminoácidos de

OVOLVOSGAIEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYIIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGN
VYTQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 52), en donde CDR_H1, CDR_H2, y CDR_H3 tienen doble subrayado;

y una región variable de cadena ligera (V_L) que tiene la secuencia de aminoácidos de

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCAQNAQNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 51), en donde CDR_L1, CDR_L2 y CDR_L3 tienen doble subrayado.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-EpCAM tiene una secuencia de cadena pesada de longitud completa de

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYIIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGN
VYIYQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO: 54), en donde CDR_H1, CDR_H2 y CDR_H3 tienen doble subrayado;

y una secuencia de longitud completa de cadena ligera de

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCAQNAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 53), en donde CDR_L1, CDR_L2, y CDR_L3 tienen doble subrayado.

En ciertas realizaciones, el CBA es un anticuerpo anti-EpCAM o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede comprender: a) al menos una región variable de cadena ligera (VL) o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad secuenciales (CDR) CDR_L1, CDR_L2 y CDR_L3, respectivamente, en donde CDR_L1 tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 78, 45, 79, 80 y 82; CDR_L2 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46; y una CDR_L3 tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 47, 81, 83, 84, 85, 86 y 87, y b) al menos una región variable de cadena pesada o fragmento de la misma que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) secuenciales CDR_H1, CDR_H2 y CDR_H3, respectivamente, en donde, en donde CDR_H1 tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 48, 57, 58, 60, 61, 62, 68, 69, 70, 77 y 88; CDR_H2 tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 49, 56, 59, 63 y 64; y una CDR_H3 tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 55, 65, 66, 67, 71, 72, 73, 74, 75 y 76.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-EpCAM o fragmento de unión a antígeno del mismo como un anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a anticuerpo activable como se describe adicionalmente a continuación. En determinadas otras realizaciones, el anticuerpo activable anti-EpCAM o el fragmento de anticuerpo de unión al anticuerpo de EpCAM activable se pueden conjugar con un compuesto de Fórmula I.

Las variantes en las CDR del anticuerpo anti-EpCAM o fragmento de unión a antígeno se resumen en las Tablas 3-6 a continuación.

Tabla 3. huEpCAM-23 4.2 (CDR y dominios variables)

huEpCAM23_ VLGv4	RSSRSLHSDGFTYL Y (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23_ VHGV2	NYIYH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQVNEKF KG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 50)
VL huEpCAM23_ VLGv4	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQK PGQSPQLLIYQTSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:51)		
VH huEpCAM23_ VHGV2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHVVQRAP GQRLEYIGWIYPGNVYIQVNEKFGRATLTADKSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)		

Tabla 4. Variantes humanizadas de huEpCAM-23 (secuencia de longitud completa)

huEpCAM 23 _VLGv4	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLHSDGFTYLYWFLQK PGQSPQLLIYQTSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCAONLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:53)
huEpCAM 23 _VHGv2-C442	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAP GQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMEL SSLRSEDTA VYYCARDGDPWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO:54)

Tabla 5. Secuencias de CDR de cadena pesada variantes de EpCAM23

5

	VH- CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Murino y quimérico			
muEpcam23	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
chEpcam23	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
Variantes humanizadas			
huEpCAM23_VHGv1	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYSQKFQ G (SEQ ID NO: 56)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23_VHGv2	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23_VHGv3	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23_VHGv4	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYSQKFQ G (SEQ ID NO: 56)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
Variantes de afinidad			
huEpCAM23HCGv2a	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2b	SYIHH (SEQ ID NO: 57)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2c	NYYIH (SEQ ID NO: 58)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
	VH- CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
huEpCAM23HCGv2d	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGDVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 59)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2e	NYFIH (SEQ ID NO: 60)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2f	NYSIH (SEQ ID NO: 61)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2g	NYWIH (SEQ ID NO: 62)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2h	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WFYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 63)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2i/2o	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2j	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WINPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 64)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2k	NYYIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	EGPWFAY (SEQ ID NO: 65)

	VH- CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
huEpCAM23HCGv2l	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPYFAY (SEQ ID NO: 66)
huEpCAM23HCGv2m/ huEpCam23 HG2-1565-A Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGAWFAY (SEQ ID NO: 67)
huEpCAM23HCGv2n	NYIMH (SEQ ID NO: 68)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2p	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2q	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2r	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23HCGv2s	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCam23HG2-1361-H Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 69)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCam23HG2-1361-D Cadena pesada	NYDIIH (SEQ ID NO: 70)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCam23HG2-1565-Y Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGYWFAY (SEQ ID NO: 71)
huEpCam23HG2-1565-S Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGSWFAY (SEQ ID NO: 72)
huEpCam23HG2-1565-F Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGFWFAY (SEQ ID NO: 73)
huEpCam23HG2-1565-G Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGGWFAY (SEQ ID NO: 74)
huEpCam23HG2-1565-T Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGTWFAY (SEQ ID NO: 75)
huEpCam23HG2-1565-V Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 48)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGVWFAY (SEQ ID NO: 76)
huEpCam23HG2-1361-I Cadena pesada	NYIIH (SEQ ID NO: 77)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)
huEpCam23HG2-1361-L Cadena pesada	NYLIH (SEQ ID NO: 88)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 49)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 55)

Tabla 6. Secuencias de CDR de cadena ligera variantes de EpCAM23

Anticuerpo	VL- CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Murino y quimérico			
muEpcam23	RSSKSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 78)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
chEpcam23	RSSKSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 78)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
Variantes humanizadas			
huEpCAM23_VLG v1	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23_VLG v2	RSSKSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 78)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23_VLG v3	RSSKSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 78)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23_VLG v4	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
Variantes de afinidad			
huEpCAM23LCGv4 a	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 79)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23LCGv4 b	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 80)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23LCGv4 c	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 81)
huEpCAM23LCGv4 e	RSSRSLHSDGFTYLS (SEQ ID NO: 82)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)

Anticuerpo	VL- CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
huEpCAM23LCGv4 f	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23LCGv4 g	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	QQNLELPNT (SEQ ID NO: 83)
huEpCAM23LCGv4 h	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	LQNLELPNT (SEQ ID NO: 84)
huEpCAM23LCGv4 i	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQYLELPNT (SEQ ID NO: 85)
huEpCAM23LCGv4 j	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQGLELPNT (SEQ ID NO: 86)
huEpCAM23LCGv4 k	RSSRSLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 46)	AQSLELPNT (SEQ ID NO: 87)

- En ciertas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo murino, de mamífero no humano, quimérico, humanizado o humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo con injerto de CDR o un anticuerpo de superficie remodelada. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión a antígeno del mismo es Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, Fab de cadena sencilla (scFab), Fv de cadena sencilla o scFv, Fv con enlace disulfuro, dominio V-NAR, IgNar, intracuerpo, IgGΔCH₂, minicuerpo, F(ab')₃, tetracuerpo, triacuerpo, diacuerpo, DuoBody, anticuerpo de un solo dominio, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ o scFv-Fc.
- En ciertas realizaciones, el agente de unión a células es un DuoBody (véase Labrijn AF, Meesters JI, Priem P, de Jong RN, van den Bremer ET, van Kampen MD, et al. Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. *Nat Protoc* 2014;9(10):2450-63), un HexaBody (véase de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, et al. A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biol* 2016;14(1):e1002344); un fragmento Fab de cadena sencilla (scFab) (véase Koerber JT, Hornsby MJ, Wells JA. An improved single-chain Fab platform for efficient display and recombinant expression. *J Mol Biol* 2015;427(2):576-86; Hust M, Jostock T, Menzel C, Voedisch B, Mohr A, Brenneis M, et al. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnol* 2007;7:14), una diana identificada por la estabilidad de la diana sensible a la afinidad del fármaco (DARTS) (véase Pai MY, Lomenick B, Hwang H, Schiestl R, McBride W, Loo JA, et al. Drug affinity responsive target stability (DARTS) for small-molecule target identification. *Methods in molecular biology* 2015;1263:287-98), y un avicuerpo (incluyendo diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos; véanse las publicaciones de EE. UU. N.º 2008/0152586 y 2012/0171115), moléculas de redireccionamiento de receptor dual (DART) (P. A. Moore et al., *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, et al., *Arthritis Rheum*, 2010 Mar 30; 62(7):1933-43; Johnson S, et al. *J Mol Biol*, 9 de abril de 2010;399(3):436-49)

25 CBA activables

- En realizaciones adicionales, el CBA proporcionado es un anticuerpo activable o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno activable (colectivamente como AA). En algunas realizaciones, el anticuerpo activable o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno activable comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno (p. ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno descritos en el presente documento), se une específicamente a un ligando en la célula diana (o "una diana") acoplado a un resto de enmascaramiento (MM), de manera que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno para unirse a la diana. En algunas realizaciones, el MM se acopla a través de una secuencia que incluye un sustrato para una proteasa, por ejemplo, una proteasa que es activa en tejido enfermo y/o una proteasa que está co-localizada con la diana en un sitio de tratamiento en un sujeto. Los anticuerpos activables son preferiblemente estables en circulación, activados en sitios previstos de terapia y/o diagnóstico pero no en tejido normal, p. ej., tejido sano u otro tejido que no son objetivo para tratamiento y/o diagnóstico, y, cuando se activan, presentan unión a la diana que es al menos comparable al anticuerpo no modificado correspondiente. En algunas realizaciones, los AA son los descritos en los documentos WO 2009/025846, WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933 y WO 2016/118629.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo activable comprende:

- (a) un resto escindible (CM) acoplado al anticuerpo o fragmento de anticuerpo (colectivamente como "AB"), en donde el CM es un polipéptido que funciona como un sustrato para una proteasa; y
- (b) un resto de enmascaramiento (MM) acoplado al anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde el MM inhibe la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo al ligando cuando el anticuerpo activable está en un estado no escindido,

en donde el anticuerpo activable en el estado no escindido tiene la disposición estructural desde el extremo N

al extremo C como sigue: (MM)-(CM)-(AB) o (AB)-(CM)-(MM).

En algunas realizaciones, el resto de enmascaramiento (o "máscara") es una secuencia de aminoácidos que está acoplada o unida de otro modo al anticuerpo y está situada dentro de la construcción de anticuerpo activable de manera que el resto de enmascaramiento reduce la capacidad del anticuerpo para unirse específicamente a la diana. Los restos de enmascaramiento adecuados se identifican usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, se identifican restos de enmascaramiento de péptidos usando los métodos descritos en el documento WO 2009/025846.

- 10 La K_d del AB modificado con un MM para con la diana puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10- 10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000- 100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que la K_d del AB no modificado con un MM o el AB parental para con la diana. Por el contrario, la afinidad de unión del AB modificado con un MM para con la diana puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10- 1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100- 1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000- 1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces menor que la afinidad de unión del AB no modificado con un MM o el AB parental para con la diana.

- 25 La constante de disociación (K_d) del MM para con el AB es generalmente mayor que la K_d del AB para con la diana. La K_d del MM para con el AB puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces mayor que la K_d del AB para con la diana. Por el contrario, la afinidad de unión del MM para con el AB es generalmente menor que la afinidad de unión del AB para con la diana. La afinidad de unión del MM para con el AB puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 o incluso 10.000.000 veces menor que la afinidad de unión del AB para con la diana.

- 40 Cuando el AB se modifica con un MM y se encuentra en presencia de la diana, la unión específica del AB a su diana se puede reducir o inhibir, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM o la unión específica del AB original a la diana. Cuando se compara con la unión del AB no modificado con un MM o la unión del AB parental a la diana, la capacidad del AB para unirse a la diana cuando se modifica con un MM se puede reducir en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e incluso 100% durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más cuando se miden in vivo o en un ensayo de inmunoabsorción in vitro de desplazamiento de la diana, como se describe en el documento WO 2010/081173.

- 45 El MM puede inhibir la unión del AB a la diana. El MM se puede unir al dominio de unión al antígeno del AB e inhibir la unión del AB a su diana. El MM puede inhibir estéricamente la unión del AB a la diana. El MM puede inhibir alostéricamente la unión del AB a su diana. En estas realizaciones, cuando el AB se modifica o se acopla a un MM y en presencia de la diana, no hay unión o no hay sustancialmente unión del AB a la diana, o no más de 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 50% de unión del AB a la diana, en comparación con la unión del AB no modificado con un MM, el AB parental o el AB no acoplado a un MM a la diana, durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más cuando se mide in vivo o en un ensayo de inmunoabsorción de desplazamiento de diana in vitro descrito en el documento WO 2010/081173.

- 55 Cuando un AB se acopla a o modifica mediante un MM, el MM puede "enmascarar", reducir o inhibir la unión específica del AB a su diana. Cuando un AB se acopla a o se modifica mediante un MM, dicho acoplamiento o modificación puede efectuar un cambio estructural que reduce o inhibe la capacidad del AB para unirse específicamente a su diana.

Un AB acoplado a o modificado con un MM puede representarse por las siguientes fórmulas (en orden de una región amino terminal (N) a una región carboxilo terminal (C)):

- 60 (MM)-(AB)
- (AB)-(MM)
- 65 (MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

donde MM es un resto de enmascaramiento, el Ab es un anticuerpo o fragmento de antígeno de unión a la diana, y L es un enlazador. En muchas realizaciones, puede ser deseable insertar uno o más enlazadores, p. ej., enlazadores flexibles, en la composición para así proporcionar flexibilidad.

En ciertas realizaciones, el MM no es una pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no contiene homología o sustancialmente no contiene homología con ninguna pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% similar a cualquier pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% idéntico a cualquier pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 25% idéntico a cualquier pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 50% idéntico a cualquier pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 20% idéntico a cualquier pareja de unión natural del Ab. En algunas realizaciones, el MM no es más de 10% idéntico a cualquier pareja de unión natural del Ab.

Los anticuerpos activables proporcionados en el presente documento también pueden incluir un resto escindible (CM). Dichos AA presentan unión activable/conmutable a la diana del AB. Los AA generalmente incluyen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB), modificado por o acoplado a un resto de enmascaramiento (MM) y un resto modificable o escindible (CM). En algunas realizaciones, el CM contiene una secuencia de aminoácidos que sirve como un sustrato para una proteasa de interés. En otras realizaciones, el CM proporciona un enlace disulfuro de cisteína-cisteína que es escindible por reducción. En otras realizaciones más, el CM proporciona un sustrato fotolítico que es activable por fotólisis.

[En algunas realizaciones, el resto escindible (o "sustrato") incluye una secuencia de aminoácidos que es un sustrato para una proteasa, normalmente una proteasa extracelular. Los sustratos adecuados se identifican usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, los sustratos peptídicos se identifican usando los métodos descritos en las patentes de EE. UU. N.º 7,666,817 y 8,563,269; y WO 2014/026136. (Véase también, Boulware et al., *Biotechnol Bioeng.* 106(3):339-346 (2010)). Opcionalmente, el CM comprende un par cisteína-cisteína capaz de formar un enlace disulfuro, que puede escindirse por la acción de un agente reductor. El CM se coloca de manera que cuando el CM es escindido por un agente de escisión (p. ej., un sustrato de proteasa de un CM es escindido por la proteasa y/o el enlace de disulfuro de cisteína-cisteína se rompe por reducción por exposición a un agente reductor), en presencia de una diana, dando como resultado un estado escindido, el Ab se une a la diana, y en un estado no escindido, en presencia de la diana, la unión del Ab a la diana es inhibida por el MM. Debe observarse que la secuencia de aminoácidos del CM puede solaparse con o estar incluida dentro del MM, de manera que todo o una parte del CM facilita el "enmascaramiento" del Ab cuando el anticuerpo activable está en la conformación no escindida.

En algunas realizaciones, el CM puede seleccionarse basándose en una proteasa que esté co-localizada en el tejido con la diana deseada del anticuerpo activable. Se conocen una diversidad de afecciones diferentes en las que una diana de interés está co-localizada con una proteasa, donde el sustrato de la proteasa es conocido en la técnica. Por ejemplo, el tejido diana puede ser un tejido canceroso, particularmente tejido canceroso de un tumor sólido. Hay muchos informes en la bibliografía de niveles aumentados de proteasas que tienen sustratos conocidos en una serie de cánceres, p. ej., tumores sólidos. Véase, p. ej., La Rocca et al, (2004) *British J. of Cancer* 90(7): 1414-1421.

Los sustratos de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a sustratos escindibles por una o más de las siguientes enzimas: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, PLASMINA, PSA, PSMA, CATEPSINA D, CATEPSINA K, CATEPSINA S, ADAMIO, ADAM12, ADAMTS, Caspasa-1, Caspasa-2, Caspasa-3, Caspasa-4, Caspasa-5, Caspasa-6, Caspasa-7, Caspasa-8, Caspasa-9, Caspasa-10, Caspasa-11, Caspasa-12, Caspasa-13, Caspasa-14 y TACE.

En algunas realizaciones, el CM es un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el CM es un polipéptido que incluye un primer resto escindible (CM1) que es un sustrato para al menos una metaloproteasa de matriz (MMP) y un segundo resto escindible (CM2) que es un sustrato para al menos una serina proteasa (SP). En algunas realizaciones, cada una de la secuencia de sustrato CM1 y la secuencia de sustrato CM2 del sustrato CM1-CM2 es independientemente un polipéptido de hasta 15 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, el CM es un sustrato para legumina, plasmina, TMPRSS-3/4, MMP-9, MTI-MMP, catepsina, caspasa, elastasa de neutrófilos humana, beta-secretasa, uPA o PSA.

La K_d del Ab modificado con un MM y un CM para con la diana puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o

- más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10- 10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000- 100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000, o 100.000-10.000.000 veces mayor que la K_d del Ab no modificado con un MM y un CM o el Ab parental para con la diana.
- 5 Por el contrario, la afinidad de unión del Ab modificado con un MM y un CM para con la diana puede ser al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 o más, o entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000- 10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, o 100.000- 10.000.000 veces menor que la afinidad de unión del Ab no modificado con un MM y un CM o el Ab parental para con la diana.
- 10

- Cuando el Ab se modifica con un MM y un CM y está en presencia de la diana pero no en presencia de un agente modificador (por ejemplo, una enzima, proteasa, agente reductor, luz), la unión específica del Ab a su diana se puede reducir o inhibir, en comparación con la unión específica del Ab no modificado con un MM y un CM o el Ab parental a la diana. En comparación con la unión del Ab parental o la unión de un Ab no modificado con un MM y un CM a su diana, la capacidad del Ab para unirse a la diana cuando se modifica con un MM y un CM se puede reducir en al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e incluso 100% durante al menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas, o 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 días, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más cuando se mide in vivo o en un ensayo de inmunoabsorción in vitro de desplazamiento de diana, como se describe en el documento WO201008117.
- 15
- 20

- Como se usa en el presente documento, la expresión estado escindido se refiere a la condición del AA después de la modificación del CM por una proteasa y/o reducción de un disulfuro cisteína-cisteína, enlace del CM y/o fotoactivación. La expresión estado no escindido, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la condición del AA en ausencia de escisión del CM por una proteasa y/o en ausencia de reducción de un enlace disulfuro cisteína-cisteína del CM y/o en ausencia de luz. Como se ha comentado anteriormente, el término AA se usa en el presente documento para referirse a un AA tanto en su estado no escindido (nativo), como en su estado escindido. Será evidente para el experto en la técnica que en algunas realizaciones un AA escindido puede carecer de un MM debido a la escisión del CM por proteasa, dando como resultado la liberación de al menos el MM (p. ej., cuando el MM no está unido al AA por un enlace covalente (p. ej., un enlace disulfuro entre restos de cisteína).
- 25
- 30

- Por activable o conmutable se entiende que el AA presenta un primer nivel de unión a una diana cuando está en un estado inhibido, enmascarado o no escindido (es decir, una primera conformación), y un segundo nivel de unión a la diana en el estado no inhibido, no enmascarado y/o estado escindido (es decir, una segunda conformación), donde el segundo nivel de unión a la diana es mayor que el primer nivel de unión. En general, el acceso de la diana al Ab del AA es mayor en presencia de un agente de escisión capaz de escindir el CM que en ausencia de tal agente de escisión. Por lo tanto, cuando el AA está en el estado no escindido, el Ab está inhibido de la unión a la diana y puede estar enmascarado de la unión a la diana (es decir, la primera conformación es tal que el Ab no puede unirse a la diana), y en el estado escindido el AB no está inhibido o no está enmascarado para la unión a la diana.
- 35
- 40

- El CM y AB del AA se pueden seleccionar de forma que el AB represente un resto de unión para una diana de interés y el CM represente un sustrato para una proteasa que se co-localiza con la diana en el sitio de tratamiento en un sujeto. Alternativamente o además, el CM es un enlace disulfuro de cisteína-cisteína que es escindible como resultado de la reducción de este enlace disulfuro. Los AA contienen al menos uno de un CM escindible por proteasa o un enlace disulfuro de cisteína-cisteína, y en algunas realizaciones incluyen ambos tipos de CM. Los AA pueden alternativamente o además incluir un sustrato fotolábil, activable por una fuente de luz. Los AA descritos en el presente documento son particularmente útiles cuando, por ejemplo, una proteasa que puede escindir un sitio en el CM está presente en niveles relativamente más altos en el tejido que contiene diana de un sitio de tratamiento (por ejemplo, tejido enfermo; por ejemplo, para el tratamiento terapéutico o el tratamiento diagnóstico) que en tejido de sitios que no son de tratamiento (por ejemplo, en tejido sano). Los AA descritos en el presente documento también son particularmente útiles cuando, por ejemplo, un agente reductor capaz de reducir un sitio en el CM está presente en niveles relativamente más altos en el tejido que contiene diana de un sitio de tratamiento o diagnóstico que en el tejido de sitios que no son de tratamiento ni de diagnóstico. Los AA descritos en el presente documento también son particularmente útiles cuando, por ejemplo, se introduce una fuente de luz, por ejemplo, mediante un láser, capaz de fotolisar un sitio en el CM, en un tejido que contiene diana de un sitio de tratamiento o diagnóstico.
- 45
- 50
- 55
- 60

- En algunas realizaciones, los AA pueden proporcionar menos toxicidad y/o efectos secundarios adversos de los que de otro modo podrían producir por la unión del Ab en los sitios que no son de tratamiento si el Ab no estuviera enmascarado o inhibido de otro modo para la unión a su diana. Cuando el AA contiene un CM que es escindible por un agente reductor que facilita la reducción de un enlace disulfuro, los AB de dichos AA se pueden seleccionar para aprovechar la activación de un Ab donde esté presente una diana de interés en un
- 65

sitio de tratamiento deseado caracterizado por niveles elevados de un agente reductor, de modo que el entorno tenga un potencial de reducción mayor que, por ejemplo, un entorno de un sitio que no es de tratamiento.

- 5 En general, un AA se puede diseñar mediante la selección de un Ab de interés y la construcción del resto del AA de modo que, cuando esté conformacionalmente restringido, el MM proporcione enmascaramiento del Ab o reducción de la unión del Ab a su diana. Criterios de diseño estructural a tener en cuenta para proporcionar esta característica funcional.

- 10 Se proporcionan AA que presentan un fenotipo conmutable de un intervalo dinámico deseado para la unión a la diana en una conformación inhibida versus una no inhibida. El intervalo dinámico generalmente se refiere a una relación de (a) un nivel máximo detectado de un parámetro bajo un primer conjunto de condiciones a (b) un valor mínimo detectado de ese parámetro bajo un segundo conjunto de condiciones. Por ejemplo, en el contexto de un AA, el intervalo dinámico se refiere a la relación de (a) un nivel máximo detectado de unión de proteína diana a un AA en presencia de proteasa capaz de escindir el CM del AA a (b) un nivel mínimo detectado de unión de proteína diana a un AA en ausencia de la proteasa. El intervalo dinámico de un AA puede calcularse como la relación de la constante de disociación en equilibrio de un tratamiento con agente de escisión de AA (p. ej., enzima) a la constante de disociación en equilibrio del tratamiento con agente de escisión de AA. Cuanto mayor sea el intervalo dinámico de un AA, mejor será el fenotipo conmutable del AA. Los AA que tienen valores de intervalo dinámico relativamente más altos (p. ej., mayores de 1) presentan fenotipos de conmutación más deseables de manera que la unión a la proteína diana por el AA ocurre en mayor grado (p. ej., ocurre predominantemente) en presencia de un agente de escisión (p. ej., enzima) capaz de escindir el CM del AA que en ausencia de un agente de escisión.

- 25 Los AA se pueden proporcionar en una variedad de configuraciones estructurales. A continuación se proporcionan fórmulas de ejemplo para los AA. Se contempla específicamente que el orden N- a C-terminal del AB, MM y CM pueda invertirse dentro de un AA. También se contempla específicamente que el CM y el MM pueden solaparse en la secuencia de aminoácidos, p. ej., de manera que el CM esté contenido dentro del MM.

- 30 Por ejemplo, los AA puede representarse por la siguiente fórmula (en orden de una región amino terminal (N) a una región carboxilo terminal (C)):

$$(MM)-(CM)-(AB)$$

- 35 (AB)-(CM)-(MM) donde MM es un resto de enmascaramiento, CM es un resto escindible, y AB es un anticuerpo o fragmento del mismo. Debe observarse que aunque MM y CM se indican como componentes distintos en la fórmula anterior, en todas las realizaciones de ejemplo (incluyendo fórmulas) descritas en el presente documento se contempla que las secuencias de aminoácidos del MM y el CM podrían solaparse, p. ej., de manera que el CM esté contenido total o parcialmente dentro del MM. Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que pueden situarse N-terminales o C-terminales de los elementos AA.

- 45 En ciertas realizaciones, puede ser deseable insertar uno o más enlazadores, p. ej., enlazadores flexibles, en la construcción de AA para proporcionar flexibilidad en una o más de la unión MM-CM, la unión CM-AB, o ambas. Por ejemplo, el AB, MM y/o CM pueden no contener un número suficiente de restos (p. ej., Gly, Ser, Asp, Asn, especialmente Gly y Ser, particularmente Gly) para proporcionar la flexibilidad deseada. Como tal, el fenotipo conmutable de tales construcciones AA puede beneficiarse de la introducción de uno o más aminoácidos para proporcionar un enlazador flexible. Además, como se describe a continuación, cuando el AA se proporciona como una construcción conformacionalmente restringida, un enlazador flexible se puede insertar operativamente para facilitar la formación y mantenimiento de una estructura cíclica en el AA no escindido.

- 55 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un AA comprende una de las siguientes fórmulas (donde la siguiente fórmula representa una secuencia de aminoácidos en la dirección N- a C-terminal o en la dirección C- a N-terminal):

$$(MM)-L_1-(CM)-(AB)$$

$$(MM)-(CM)-L_1-(AB)$$

- 60 $(MM)-L_1-(CM)-L_2-(AB)$

$$CiClo[L_1-(MM)-L_2-(CM)-L_3-(AB)]$$

- 65 en donde MM, CM y AB son como se definen antes; en donde L_1 , L_2 y L_3 están cada uno independiente y opcionalmente presentes o ausentes, son enlazadores flexibles iguales o diferentes que incluyen al menos 1

aminoácido flexible (p. ej., Gly); y en donde cuando está presente CiClo, el AA tiene la forma de una estructura cíclica debido a la presencia de un enlace disulfuro entre un par de cisteínas en el AA. Además, las fórmulas anteriores proporcionan secuencias de aminoácidos adicionales que pueden situarse N-terminales o C-terminales de los elementos AA. Debe entenderse que en la fórmula CiClo[L₁-(MM)-L₂-(CM)-L₃-(AB)], las cisteínas responsables del enlace disulfuro pueden estar situadas en el AA para permitir una o dos colas, generando de este modo una estructura de lazo u omega cuando el AA está en una estructura unida por disulfuro (y por lo tanto en estado conformacionalmente restringido). La secuencia de aminoácidos de la cola o colas puede proporcionar características adicionales de AA, tales como la unión a un receptor diana para facilitar la localización del AA, aumentando la semivida en suero del AA, y similares. Restos de direccionamiento (p. ej., un ligando para un receptor de una célula presente en un tejido diana) y restos que prolongan la semivida en suero (p. ej., polipéptidos que se unen a proteínas séricas, tales como inmunoglobulina (p. ej., IgG) o seroalbúmina (p. ej., seroalbúmina humana (HSA))).

Los enlazadores adecuados para su uso en los AA como se describen en el presente documento son generalmente aquellos que proporcionan flexibilidad del AB modificado o el AA para facilitar la inhibición de la unión del AB a la diana. Tales enlazadores se denominan generalmente enlazadores flexibles. Los enlazadores adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de cualquiera de diferentes longitudes adecuadas, tal como de 1 aminoácido (p. ej., Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

[Los enlazadores flexibles de ejemplo incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n y (GGGS)_n, donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como unión neutra entre los componentes. La glicina accede a un espacio phi-psi significativamente mayor que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los restos con cadenas laterales más largas (véase Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Los enlazadores flexibles de ejemplo incluyen, pero no se limitan a Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser-Gly, Gly-Ser-Ser-Ser-Gly y similares. El experto en la técnica reconocerá que el diseño de un AA puede incluir enlazadores que son total o parcialmente flexibles, de manera que el enlazador puede incluir un enlazador flexible así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura de AA deseada.

Además de los elementos descritos anteriormente, los AB y AA modificados pueden contener elementos adicionales tales como, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos N- o C-terminal del AA. Por ejemplo, los AA pueden incluir un resto de direccionamiento para facilitar el suministro a una célula o tejido de interés. Además, el AA puede proporcionarse en el contexto de una proteína de andamiaje para facilitar la presentación del AA en una superficie celular.

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable también incluye un péptido señal. En algunas realizaciones, el péptido señal se conjuga con el anticuerpo activable, a través de un espaciador. En algunas realizaciones, el espaciador se conjuga con el anticuerpo activable, en ausencia de un péptido señal. En algunas realizaciones, el espaciador se une directamente al MM del anticuerpo activable. En algunas realizaciones, el espaciador se une directamente al MM del anticuerpo activable, en la disposición estructural desde el extremo N al extremo C del espaciador-MM-CM-AB.

Se conocen en la técnica espaciadores adecuados y la tecnología de espaciadores y pueden usarse rutinariamente para incorporar espaciadores en algunas realizaciones de los anticuerpos activables proporcionados. Véase, por ejemplo, el documento WO 2016/179285 (p. ej., en las páginas 52-53).

En algunas realizaciones, el anticuerpo activable se expone a y es escindido por una proteasa de manera que, en el estado activado o escindido, el anticuerpo activado incluye una secuencia de cadena ligera que incluye al menos una porción de la secuencia de LP2 y/o CM después de que la proteasa ha escindido el CM.

El CM es escindido específicamente por al menos una proteasa a una velocidad de aproximadamente 0,001-1500 × 10⁴ M⁻¹S⁻¹ o al menos 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 o 1500 × 10⁴ M⁻¹S⁻¹. En algunas realizaciones, el CM se escinde específicamente a una velocidad de aproximadamente 100.000 M⁻¹S⁻¹. En algunas realizaciones, el CM se escinde específicamente a una velocidad de aproximadamente 1 × 10² a aproximadamente 1 × 10⁶ M⁻¹S⁻¹ (es decir, de aproximadamente 1 × 10² a aproximadamente 1 × 10⁶ M⁻¹S⁻¹). Para la escisión específica por una enzima, se hace contacto entre la enzima y el CM. Cuando el anticuerpo activable, que comprende un Ab (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a EpCAM) acoplado a un MM y un CM está en presencia de la diana y suficiente actividad enzimática, el CM puede escindirse. Una actividad enzimática suficiente puede referirse a la capacidad de la enzima para hacer contacto con el CM y efectuar la escisión. Se puede prever

fácilmente que una enzima puede estar en la proximidad del CM pero incapaz de escindir debido a otros factores celulares o modificación de proteínas de la enzima.

Producción de conjugados de agente de unión a células-fármaco

5

Con el fin de ligar uno cualquiera de los compuestos citotóxicos o derivados de los mismos descritos en el presente documento al agente de unión a células, el compuesto citotóxico puede comprender un resto enlazador con un grupo reactivo unido al mismo. Estos compuestos pueden estar unidos directamente al agente de unión a células. En los ejemplos se describen procedimientos representativos para ligar los compuestos citotóxicos que tienen un grupo reactivo unido a estos con el agente de unión a células para producir los conjugados de agente de unión a células-agente citotóxico.

10

15

Se puede hacer reaccionar primero un reactivo de reticulación bifuncional con el compuesto citotóxico para proporcionar el compuesto que lleva un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este (es decir, compuesto de fármaco-enlazador), que luego puede reaccionar con un agente de unión a células. Alternativamente, un extremo del reactivo de reticulación bifuncional puede reaccionar primero con el agente de unión a células para proporcionar el agente de unión a células que lleva un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este, que luego puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles frente a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles frente a peptidasa y enlaces lábiles frente a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 5,208,020; 5,475,092; 6,441,163; 6,716,821; 6,913,748; 7,276,497; 7,276,499; 7,368,565; 7,388,026 y 7,414,073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces tioéter y lábiles frente a peptidasa. Otros enlazadores que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enlazadores no escindibles, tales como los que se describen detalladamente en la publicación de EE. UU. número 2005/0169933, o enlazadores cargados o enlazadores hidrofílicos y se describen en los documentos US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976.

20

25

30

Una solución de un agente de unión a células (p. ej., un anticuerpo) en tampón acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente de reticulación bifuncional, tal como 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB), 4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El agente de unión a células modificado (p. ej., anticuerpo modificado) luego se puede hacer reaccionar con el compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en el presente documento, para producir un conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico unido por disulfuro de la presente invención.

35

40

El compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en el presente documento puede reaccionar con un agente de reticulación bifuncional tal como 4-(2-piridilditio)pentanoato de *N*-succinimidilo (SPP), 4-(2-piridilditio)butanoato de *N*-succinimidilo (SPDB), 4-(2-piridilditio)2-sulfobutanoato de *N*-succinimidilo (sulfo-SPDB) para formar un compuesto de agente citotóxico-enlazador, que luego puede reaccionar con un agente de unión a células para producir un conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico unido por disulfuro de la presente invención. El compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede preparar in situ sin purificación antes de la reacción con el agente de unión a células. Alternativamente, el compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede purificar antes de la reacción con el agente de unión a células.

45

50

El conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico se puede purificar usando cualquier método de purificación conocido en la técnica, tal como los descritos en la patente de EE. UU. N.º 7,811,572 y publicación de EE. UU. N.º 2006/0182750. Por ejemplo, el conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico se puede purificar utilizando filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, filtración de no adsorción o combinación de estos. Preferiblemente, se utiliza filtración de flujo tangencial (TFF, también llamada filtración de flujo cruzado, ultrafiltración y diafiltración), y/o resinas de cromatografía de adsorción para la purificación de los conjugados.

55

60

65

El número de moléculas citotóxicas unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar de forma espectrofotométrica midiendo la relación de la absorbancia a 280 nm y 330 nm. En algunas realizaciones, se puede unir un promedio de 1-10 compuestos citotóxicos/molécula(s) de anticuerpo por los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el número promedio de compuestos citotóxicos unidos por molécula de anticuerpo (DAR) es de 2-12. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 2-10. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 2-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 2,5-4,0. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 4-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 5-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 6-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 6,5-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,1-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,2-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,3-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,4-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,5-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,6-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,7-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,8-8. En algunas realizaciones, el valor de DAR es 7,9-8. En alguna

realización, una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende los conjugados de la invención tiene un valor de DAR entre 2 y 12, entre 2 y 10, más específicamente entre 6 y 8. En algunas realizaciones, el número promedio de compuestos citotóxicos unidos por molécula de anticuerpo (DAR) es de 7-8, y más específicamente 8.

5

En algunas realizaciones, cuando el anticuerpo se une al agente citotóxico a través de un grupo tiol de cisteína, el conjugado tiene 1 compuesto citotóxico por molécula de anticuerpo. En algunas realizaciones, el conjugado tiene 1 o 2 compuestos citotóxicos por molécula de anticuerpo. En algunas realizaciones, el conjugado tiene 2 compuestos citotóxicos por molécula de anticuerpo. En algunas realizaciones, el número promedio de compuestos citotóxicos unidos por molécula de anticuerpo (DAR) es de 1,5 a 2,5, más específicamente de 1,8-2,2. En algunas realizaciones, una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende los conjugados de la invención tiene un valor de DAR entre 1,0 y 2,5, entre 1,5 y 2,5, más específicamente entre 1,8 y 2,2 o entre 1,9 y 2,1.

10

15 Se describen procedimientos representativos para preparar los conjugados de agente de unión a células-fármaco de la presente invención en el documento 8,765,740 y publicación de solicitud de EE. UU. N.º 2012/0238731.

Composiciones

20

La presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento, derivados de los mismos o conjugados de los mismos (y/o solvatos, hidratos y/o sales de los mismos) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar en diversas formas para tratamiento local o sistémico. La administración puede ser tópica (tal como en las membranas mucosas, incluido el suministro vaginal y rectal), tal como parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos; pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica); oral; o parenteral que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal (p. ej., intratecal o intraventricular). En algunas realizaciones particulares, la administración es intravenosa. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se pueden utilizar *in vitro* o *ex vivo*.

30

35

Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y los expertos en la técnica pueden determinarlos según lo exija la situación clínica. Ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente de 1 mg/mL a 25 mg/mL de seroalbúmina humana, (2) solución salina al 0,9% (NaCl al 0,9% p/v), y (3) dextrosa al 5% (p/v) y también puede contener un antioxidante, tal como triptamina y un agente estabilizante, tal como Tween 20.

40

Métodos de uso

45

Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano).

La presente invención incluye una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, el cáncer incluye cáncer hematológico, leucemia y linfoma. En ciertas realizaciones, el cáncer es cáncer de un órgano linfático o una neoplasia maligna hematológica. En ciertas realizaciones, el cáncer es un linfoma o una leucemia.

50

Por ejemplo, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en: leucemia mieloide aguda (AML, que incluye AML con baja CD33, AML con P-glicoproteína positiva, AML recidivante o AML refractaria), leucemia mielógena crónica (CML), que incluye crisis blástica de CML y oncogén de Abelson asociado con CML (translocación de Bcr-ABL), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye, pero no se limita a leucemia linfoblástica aguda B o leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), que incluye el síndrome de Richter o transformación de CLL de Richter, leucemia de células pilosas (HCL), leucemia promielocítica aguda (APL), enfermedad linfoproliferativa crónica de células B (B-CLPD), leucemia linfocítica crónica atípica (preferiblemente con una expresión de CD11c marcada), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blástica (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), que incluye leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt.

60

65

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de

esófago, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (TNBC)), cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer mieloide, melanoma y cáncer linfóide. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico. En realizaciones adicionales, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico (células escamosas, células no escamosas, adenocarcinoma o carcinoma indiferenciado de células grandes), cáncer colorrectal (adenocarcinoma, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores estromales gastrointestinales, linfoma colorrectal primario, leiomiomasarcoma o carcinoma de células escamosas) o cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo (TNBC)).

La presente invención, así descrita en general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Los compuestos 2b, 2d, 4b, 4d, 7b, 8b, 8c, 22e, 34a y 34b no son de la invención.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se usan para los siguientes términos:

DAR Relación de fármaco a anticuerpo;

DIPEA Diisopropiletilamina;

DMF Dimetilformamida;

DMSO Dimetilsulfóxido;

DMTMM Cloruro de (4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolinio);

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético;

EPPS Ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico;

Fmoc 9-fluoroenilmetoxycarbonilo;

HMPA Hexametilfosforamida;

i.v. Intravenoso;

NMM N-metilmorfolina;

PPTS *p*-toluenosulfonato de piridinio;

SEC cromatografía de exclusión por tamaño;

EEM Error estándar de la media;

TCEP Hidrocloruro del ácido 3,3',3"-fosfinotriisopropilpropanoico;

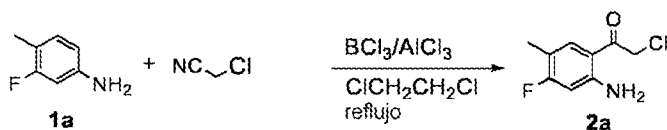
TEA Trietilamina; y

TFA Ácido trifluoroacético.

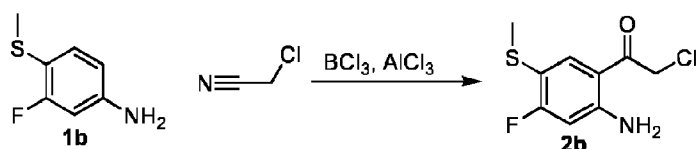
La FIG. 1 y FIG. 2 representan la síntesis de unidades estructurales de camptotecina. La FIG. 3, FIG. 4 y FIG. 5 representan la síntesis de las cadenas laterales. La FIG. 6 y FIG. 7 representan el acoplamiento de las unidades estructurales de camptotecina con las cadenas laterales. La FIG. 8 representa la síntesis de metabolitos adicionales de camptotecina. La FIG. 9 representa el acoplamiento de unidades estructurales de camptotecina con cadenas laterales. La FIG. 10 representa la síntesis de compuestos adicionales de camptotecina.

La FIG. 11 representa compuestos usados para comparación, que incluyen una estructura genérica de Ab-999 de un ADC que lleva el resto 999 unido a través de disulfuros reducidos entre cadenas de un anticuerpo. Los compuestos 998 y 999 se prepararon como se describe en la patente de EE. UU. 2016/0297890 A1 y las referencias en la misma.

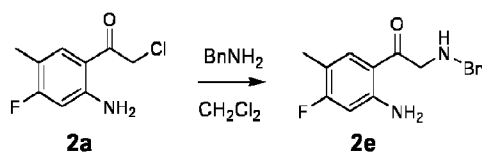
Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos 2a-2e



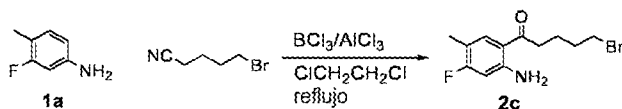
- 2a: Al matraz que contenía 1,2-dicloroetano anhidro (80 mL) se añadió tricloruro de boro 1 M en diclorometano (16 mL, 16 mmol) y después se enfrió a 0 °C con un baño de agua helada. Se añadió 1a (2,5 g, 20 mmol) en porciones y después se agitó a 0 °C durante 10 min, después se añadió cloroacetronitrilo (2,7 mL, 23,5 mmol) seguido de la adición de cloruro de aluminio (3,5 g, 26 mmol). El baño de hielo se retiró y la solución de reacción se calentó gradualmente a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 min, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 39 h. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua fría (40 mL) lentamente seguido de la adición de solución de HCl al 5% en agua. Después de 30 min, se diluyó con diclorometano (80 mL). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se separaron los componentes volátiles del filtrado a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 200 g, 80 mL/min, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 5 min, después a 95% de CH₃CN en 22 min y después 95% de CH₃CN durante 5 min) para dar el compuesto 2a como un sólido blanquecino (1,52 g, 38% de rendimiento). MS (ESI): (M + H)⁺ calc. 202,0, encontrado 202,2.



- 2b: Se añadieron AlCl₃ (1,0 g, 7,7 mmol) y tolueno (3,4 mL) a un matraz de 100 mL equipado con agitación magnética. Se añadió una solución de 1b (1,0 g, 6,4 mmol) en tolueno (3,85 mL) al matraz en atmósfera de nitrógeno seguido de BCl₃ 1 M en tolueno (3,85 mL, 7,6 mmol). Se añadió gota a gota 2-cloroacetronitrilo (1,7 mL, 26,6 mmol) durante aproximadamente 2 min, después el matraz se equipó con un refrigerante de reflujo y se calentó en un baño de aceite a 114 °C durante 3 h. El baño de calentamiento se retiró y después de 4 min se colocó un termómetro en el matraz. Después de enfriar a 50 °C, la mezcla de reacción se vertió en agua desionizada (50 mL) y después se extrajo con acetato de etilo (2 x 60 mL). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y después el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a vacío. El residuo se recogió en un volumen mínimo de acetato de etilo y después se purificó en una columna de sílice de 80 g eluyendo con hexanos:acetato de etilo 92:8. Las fracciones que contenían el producto deseado puro se combinaron y el disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a vacío para dar 0,69 g del producto deseado 2b (46% de rendimiento) como un sólido amarillo. MS (M + H)⁺ 233,8; RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,79 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,40 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 4,62 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,54 (s, 4H).



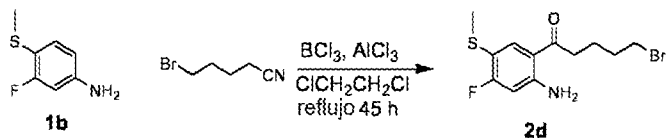
- 2e: A una solución del compuesto 2a (155 mg, 0,77 mmol) en diclorometano anhidro (1,5 mL) se le añadió bencilamina (0,68 mL, 6,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 12 g, CH₂Cl₂/MeOH, MeOH de 0 a 10% en 16 minutos) para dar 156 mg de 2e (74% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 273,4 (M + H)⁺.



- 2c: Al matraz que contenía 1,2-dicloroetano anhidro (50 mL) se añadió tricloruro de boro 1 M en diclorometano (9,95 mL, 9,95 mmol) y después se enfrió a 0 °C con un baño de agua helada. Se añadió 1a (1,56 g, 12,4 mmol) en porciones y después se agitó a 0 °C durante 10 minutos, se añadió 5-bromovaleronitrilo (1,72 mL, 14,9 mmol) seguido de la adición de cloruro de aluminio (2,16 g, 16,2 mmol). El baño de hielo se retiró y la solución de reacción se calentó gradualmente a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 39,5 horas. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua fría (25 mL) lentamente seguido de la adición de solución de HCl al 5% en agua. Después de 30 min, se diluyó con diclorometano (50 mL). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se separaron los componentes

volátiles del filtrado a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 100 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 5 minutos, después a 95% de CH₃CN en 15 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar el compuesto 2c como un sólido blanquecino (1,42 g, 40% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 289,2 (M + H)⁺.

5



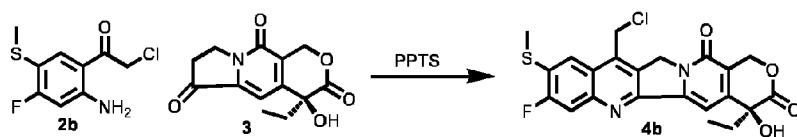
2d: A un matraz seco que contenía 1,2-dicloroetano anhidro (40 mL) se añadió tricloruro de boro (4,73 mL, 4,73 mmol, 1 M en CH₂Cl₂) y se enfrió a 0 °C con un baño de agua helada. Se añadió el compuesto 1b (0,93 g, 5,92 mmol) en porciones y después de agitar a 0 °C durante 10 minutos, se añadió 5-bromovaleronitrilo (0,819 mL, 7,1 mmol) seguido de la adición de cloruro de aluminio (1,025 g, 7,69 mmol). El baño de hielo se retiró y la solución de reacción se calentó gradualmente a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 45 horas. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua fría (25 mL) lentamente seguido de 5 mL de solución de HCl al 5% en agua. Después de 30 min, se diluyó con diclorometano (50 mL). La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se separaron los componentes volátiles del filtrado a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 100 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos, después a 95% de CH₃CN en 15 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar el compuesto 2d como un sólido blanquecino (0,776 g, 41% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 321,0 (M + H)⁺.

10

15

20

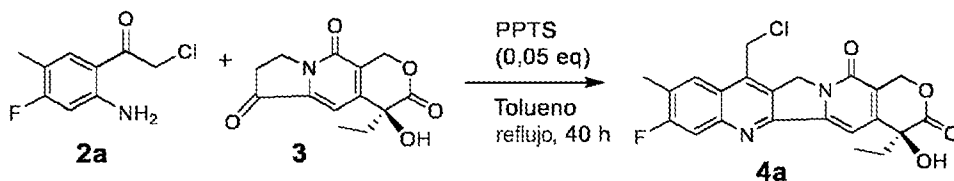
Ejemplo 2. Procedimiento general para los compuestos 4a - 4d



25

4b: El compuesto 3 (777 mg, 2,95 mmol), 2b (690 mg, 2,95 mmol) y PPTS (37 mg, 0,15 mmol) se suspendieron en un matraz de 50 mL equipado con un refrigerante de reflujo que contenía tolueno anhidro (10 mL). La reacción se calentó a reflujo con agitación magnética bajo una atmósfera de argón durante la noche y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se filtró al vacío y los sólidos se lavaron con tolueno (5 mL) para dar 1,08 g del producto deseado 4b como un sólido marrón (79% de rendimiento). MS (M + H)⁺ 461, MS (M - H)⁻ 459.

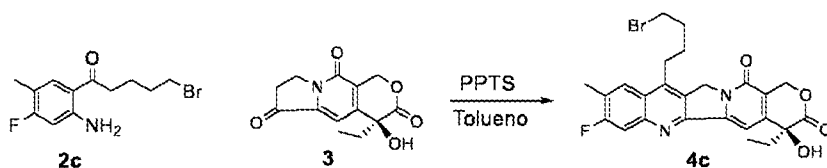
30



35

4a: Preparado por el procedimiento general, una solución del compuesto 2a (3,15 g, 15,64 mmol) y el compuesto 3 (3,92 g, 14,89 mmol) en tolueno (200 mL) con PPTS (187 mg, 0,75 mmol) se calentó a reflujo durante 40 horas para dar 4a (4,74 g) con 74% de rendimiento. MS (ESI): *m/z* 429,2. 431,0 (M + H)⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,37 (d, *J* = 8,3, 1,2 Hz, 1H), 8,10 - 7,90 (m, 1H), 7,33 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,55 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 5,85 - 5,20 (m, 6H), 2,61 - 2,45 (m, 3H), 1,98 - 1,76 (m, 2H), 0,89 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). HRMS (M + H)⁺ calc. 429,1017, encontrado 429,1023.

40

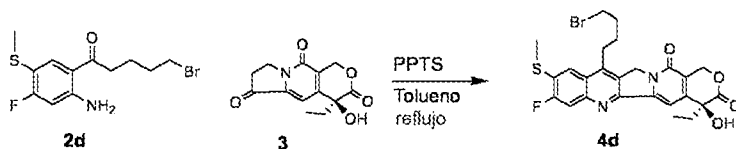


45

4c: Siguiendo el procedimiento general, una solución del compuesto 2c (1,695 g, 5,88 mmol) y el compuesto 3 (1,548 g, 5,88 mmol) en tolueno (50 mL) con PPTS (0,074 g, 0,294 mmol) se calentó a reflujo durante 21,5 horas. El disolvente se evaporó y el residuo se recogió en un volumen mínimo de metanol al 10% en CH₂Cl₂ y luego se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice 40 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 10% de MeOH a lo largo de 20 min) para dar 4c (2,56 g) con 84% de rendimiento después de cromatografía en gel de

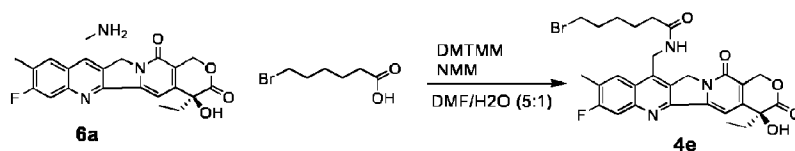
silíce (columna de sílice 40 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 10% de MeOH en 20 minutos). MS (ESI): *m/z* 515,2 y 517,1 (M + H)⁺, 513,1 y 515,1 (M - H)⁻. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,39 - 8,17 (m, 1H), 7,89 (d, *J* = 10,9 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 5,44 (s, 2H), 5,31 (s, 2H), 3,65 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,28 - 3,09 (m, 2H), 2,51 (t, *J* = 1,8 Hz, 3H), 2,15 - 1,95 (m, 2H), 1,95 - 1,71 (m, 4H), 0,88 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H). HRMS (M + H)⁺ calc. 515,0981, encontrado 515,0992.

5



4d: Siguiendo el procedimiento general, una solución del compuesto 2d (776 mg, 2,42 mmol) y el compuesto 3 (670 mg, 2,54 mmol) en tolueno (20 mL) con PPTS (30 mg, 0,12 mmol) se calentó a reflujo durante 24 horas para dar 4d (1,02 g) con 77% de rendimiento después de cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 40 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 10% de MeOH en 23 minutos). MS (ESI): *m/z* 547,0 y 548,9 (M + H)⁺, 544,8 y 546,8 (M - H)⁻.

10

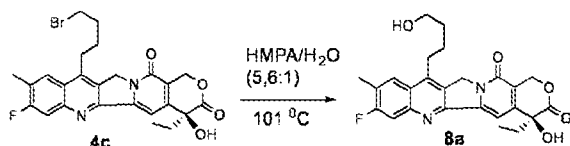


15

4e: A una solución de 6a (10 mg, 0,024 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadieron NMM (3 µL, 0,027 mmol) y ácido 6-bromohexáico (7,2 mg, 0,037 mmol) y la solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (13,5 mg, 0,049 mmol) en agua desionizada. Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de 4 g, CH₂Cl₂/MeOH, MeOH de 0 a 10% en 15 minutos) para dar 15 mg de 4e (98% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 586,1 (M + H)⁺, 588,0 (M + H)⁺.

20

25 Ejemplo 3. Síntesis de los Compuestos 8a-8e y 8p



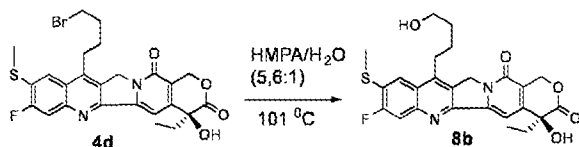
25

8a: Una solución del compuesto 4c (860 mg, 1,67 mmol) en HMPA (5 mL) y agua desionizada (0,9 mL) se calentó a 101 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y la solución se cargó en un cartucho C18 y se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos, después a 95% de CH₃CN en 15 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar 8a como un sólido que estaba contaminado con impurezas. Se purificó adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH) para dar 392 mg de 8a como un sólido blanquecino (51% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 453,2 (M + H)⁺, 451,1 (M - H)⁻. RMN ¹H (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 8,00 (dd, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 1H), 7,52 - 7,33 (m, 2H), 5,53 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 5,33 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 5,18 - 4,96 (m, 2H), 3,66 (q, *J* = 7,2, 6,7 Hz, 2H), 3,24 - 3,06 (m, 2H), 2,45 (dd, *J* = 20,1, 2,7 Hz, 3H), 1,94 (tdd, *J* = 7,1, 6,0, 2,0 Hz, 2H), 1,88 - 1,66 (m, 4H), 1,00 (td, *J* = 7,4, 2,5 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, Metanol-*d*₄) δ 173,32, 163,68, 161,19, 157,56, 151,44, 151,09, 148,68, 148,56, 146,06, 144,46, 128,10, 127,89, 127,22, 125,66, 125,60, 124,26, 118,92, 111,91, 111,69, 97,96, 72,74, 65,28, 60,97, 49,40, 32,15, 30,80, 29,00, 25,96, 14,09, 14,06, 6,75; HRMS (M + H)⁺ calc. 453,1826, encontrado 453,1832.

30

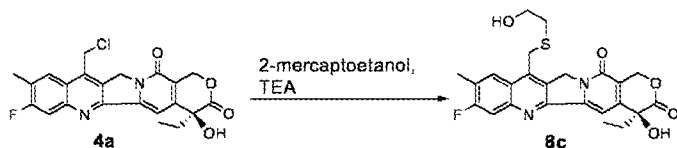
35

40



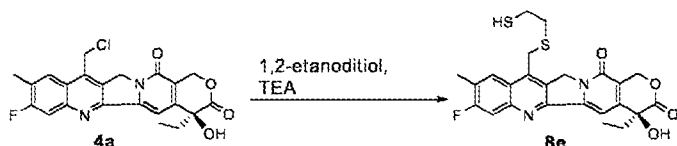
45

8b: Preparado a partir de 4d usando el procedimiento 8a. Rendimiento (48% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* (M + H)⁺ 485,7.

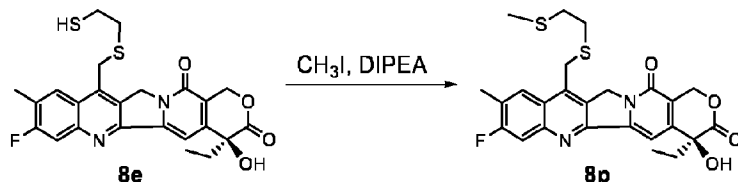


8c: El compuesto 4a (100 mg, 0,23 mmol) se disolvió en DMF anhidra (2 mL) a la que se añadió 2-mercaptoetanol (0,2 mL, 2,8 mmol) seguido de TEA (0,13 mL, 0,94 mmol) y se agitó de forma magnética durante 20 min. La mezcla de reacción se inyectó en una columna C18 de presión media de 250 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,2%:acetonitrilo 95:5. La columna se eluyó a 50 mL/min con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,2%:acetonitrilo 95:5 durante 5 min, después con un gradiente lineal de acetonitrilo al 5% a los 5 min a acetonitrilo al 95% a los 35 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 85 mg de 8c (78% de rendimiento). MS (ESI): m/z 471,4 ($M + H$)⁺. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,25 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,78 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,22 (s, 2H), 4,87 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 4,47 - 4,28 (m, 2H), 3,56 (q, J = 6,3 Hz, 2H), 3,33 (s, 2H), 2,62 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,48 - 2,44 (m, 3H), 1,87 (hept, J = 7,1, Hz, 2H), 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,44, 163,07, 160,58, 156,69, 152,16, 149,97, 148,66, 148,53, 145,48, 140,06, 128,18, 128,16, 127,28, 127,07, 126,61, 126,54, 123,59, 119,09, 112,56, 112,35, 96,77, 72,36, 65,26, 60,83, 49,69, 34,38, 30,31, 28,78, 15,24, 15,20, 7,75. HRMS ($M + H$)⁺ calc. 471,1390, encontrado 471,1393.

8d: Preparado de forma similar a 8c mediante la reacción de 1,3-propanoditio con 4a (60% de rendimiento). MS (ESI): m/z 501,7 ($M + H$)⁺.

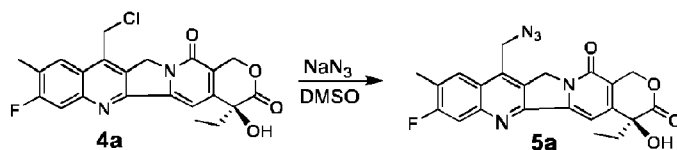


8e: Preparado de manera similar a 8c mediante la reacción de 1,2-ethanoditio con 4a (47% de rendimiento). MS (ESI): ($M + H$)⁺ calc. 487,1, encontrado 487,3.



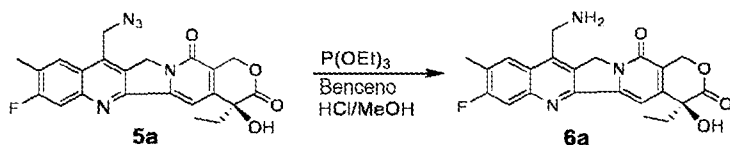
8p: Se disolvió el compuesto 8e (28 mg, 0,057 mmol) en THF anhidro (1 mL) al que se añadió una emulsión de NaH al 60% en aceite mineral (5 mg, 2,1 mmol) con agitación magnética. Después de 2 min, se añadió yodometano (20 µL, 0,32 mmol). Después de 20 min, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo se recogió en DMF anhidra (1 mL) y luego se purificó por cromatografía de C18 a presión media. Columna C18 de 100 g, 50 mL/min, ácido fórmico al 0,2% en agua desionizada con acetonitrilo al 5% de 0 - 5 min, después un gradiente lineal 5% - 95% de 5 min - 28 min. Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado, se congelaron y liofilizaron para dar 15 mg de 8p como un sólido amarillo (54% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,40 - 8,27 (m, 1H), 7,89 (d, J = 10,8 Hz, 1H), 7,31 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,39 (s, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,57 - 4,39 (m, 2H), 2,84 - 2,69 (m, 3H), 2,44 (m, 1H), 2,07 (m, 1H), 2,02 (s, 3H), 1,87 (m, 2H), 1,23 (s, 1H), 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H). HRMS ($M + H$)⁺ calc. 501,1318; encontrado 501,1322.

Ejemplo 4. Síntesis del compuesto 5a



5a: Una solución de 4a (2 g, 4,66 mmol) y azida sódica (0,455 g, 7,0 mmol) en 25 mL de DMSO anhidro se agitó a temperatura ambiente durante 6 h seguido de dilución con agua desionizada (200 mL). El producto precipitó y se recogió por filtración al vacío y después se secó al vacío para dar 2,03 g de 5a en (100% de rendimiento). MS (ESI): ($M + H$)⁺ calc. 435,1, encontrado 436,2, MS (ESI): ($M - H$)⁻ calc. 433,1, encontrado 434,2.

Ejemplo 5. Síntesis del compuesto 6a

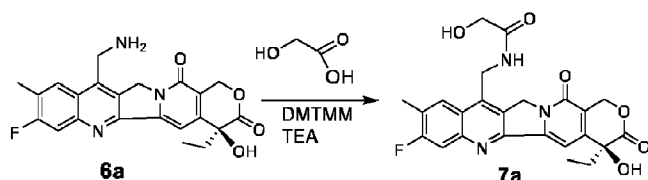


5

6a: A una solución de 5a (2,03 g, 4,66 mmol) en benceno anhidro (60 mL) se añadió fosfito de trietilo (1,94 g, 11,66 mmol) y la solución se lavó con barrido de argón y después se calentó a reflujo durante 4 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió HCl metanólico 3 M (30 mL) y se calentó a reflujo (baño de 80 °C) durante 38 h. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se filtró al vacío para dar 6a (1,016 g) como un sólido blanquecino. El filtrado se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 12 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 16 minutos) para dar 6a adicional (0,079 g). Se obtuvieron 1,09 g de 6a combinado (57% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,62 (s, 3H), 8,43 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 10,7 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 5,59 (s, 2H), 5,45 (s, 2H), 4,70 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,55 (s, 3H), 1,88 (hept, *J* = 7,1 Hz, 2H), 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). MS (ESI): *m/z* calc. 410,2, encontrado 410,4 (M + H)⁺; 408,1 (M - H)⁻.

15

Ejemplo 6. Síntesis del compuesto 7a



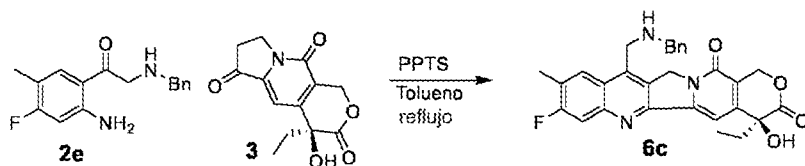
20

7a: A una solución de 6a (7,5 mg, 0,018 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadieron trietilamina (2,6 µL, 0,018 mL) y ácido glicólico (1,5 mg, 0,020 mmol). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (10,1 mg, 0,037 mmol) en agua desionizada (0,1 mL). Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 4 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos) para dar el producto deseado 7a (8 mg, 93% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 468,2 (M + H)⁺, 466,1 (M - H)⁻. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0,88 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 1,79 - 1,98 (m, 3H), 2,55 (s, 0H), 3,84 (d, *J* = 5,6 Hz, 3H), 4,85 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 5,44 (s, 3H), 5,51 (s, 2H), 5,58 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 6,53 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,90 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 8,48 (d, *J* = 1,2, 8,3 Hz, 1H), 8,76 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) δ 172,95, 172,89, 157,23, 152,85, 150,44, 149,07, 145,85, 140,12, 129,27, 127,97, 124,28, 119,63, 97,23, 72,83, 65,74, 61,91, 54,06, 50,54, 49,58, 44,06, 37,34, 30,72, 15,74, 8,22. HRMS (M + H)⁺ calc. 468,1571, encontrado 468,1593.

30

Ejemplo 7. Síntesis del compuesto 6c

35

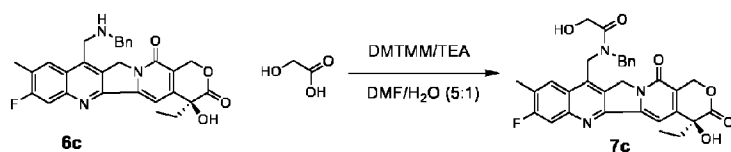


40

6c: Una solución agitada del compuesto 2e (129 mg, 0,47 mmol), el compuesto 3 (125 mg, 0,47 mmol) y PPTS (131 mg, 0,52 mmol) en tolueno anhidro (10 mL) se puso brevemente al vacío y después se calentó a reflujo durante 20 horas. La solución de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se separaron los componentes volátiles y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de 12 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 16 minutos) para dar 196 mg de producto impuro como sólido negro. Se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, de 20% a 60% de CH₃CN en 15 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar 6c (31 mg, 13% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 500,4 (M + H)⁺, 498,3 (M - H)⁻.

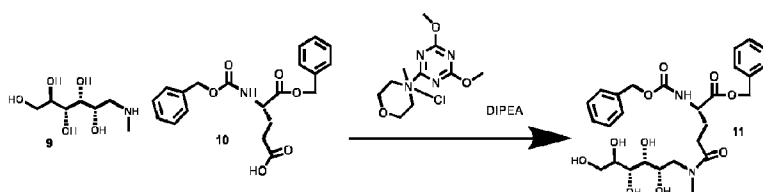
45

Ejemplo 8. Síntesis del compuesto 7c

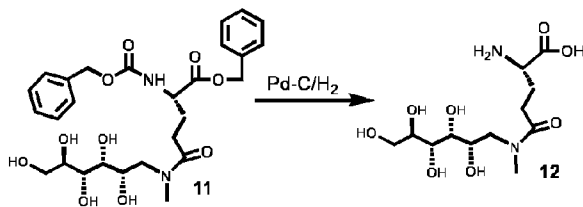


7c: A la solución de 6c (8,5 mg, 0,017 mmol) en DMF (0,5 mL) se le añadieron trietilamina (2,4 μ L, 0,017 mmol) y ácido glicólico (1,9 mg, 0,026 mmol). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (9,4 mg, 0,034 mmol) en agua desionizada (0,1 mL). Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño a 35 °C) y el residuo se purificó por HPLC semipreparativa (columna C18, CH₃CN/H₂O, de 25% a 65% de CH₃CN en 23 minutos) para dar 2,5 mg de 7c (26% de rendimiento). MS (ESI): m/z 558,5 (M + H)⁺, 556,3 (M - H)⁻.

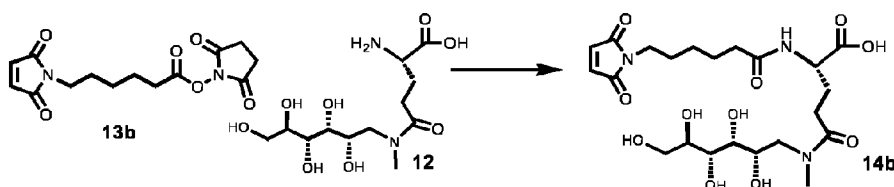
Ejemplo 9. Síntesis de cadenas laterales



11: Se pesaron N-Metil-D-Glucamina 9 (3,94 g, 20,19 mmol) y Z-L-Glu-OBn 10 (5 g, 13,46 mmol) en un matraz de 200 mL al que se añadió DMF (50 mL) y se agitó magnéticamente. A continuación, se añadió DIPEA (2,351 mL, 13,46 mmol) seguido de DMTMM (5,22 g, 18,85 mmol) en DMF (30 mL) y agua desionizada (10 mL). Después de 2 h se cargó 1/3 de la reacción en un cartucho C18 de 450 g que se equilibró previamente con agua desionizada:acetonitrilo 95:5. La columna se eluyó a 100 mL/min con agua desionizada:acetonitrilo 95:5 durante 5 min y después con un gradiente lineal de 5% de acetonitrilo a 95% de acetonitrilo a lo largo de 38 min. La cromatografía se repitió dos veces más y se reunieron las fracciones que contenían el producto deseado puro. El disolvente se separó por evaporación rotatoria a vacío. Se añadió metanol (100 mL) y se evaporó 2 veces para dar 5 g del producto deseado 11 como un aceite incoloro espeso (68% de rendimiento). MS (ESI): MS (M + H)⁺ calc. 549,2, encontrado 549,3, MS (ESI): (M - H)⁻ calc. 547,2, encontrado 547,2.

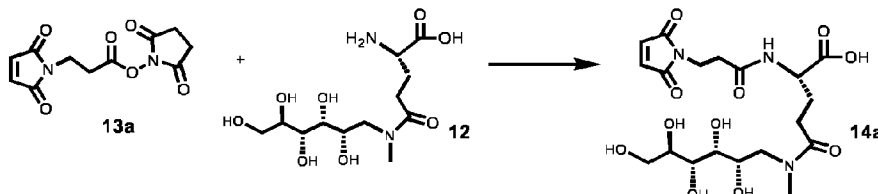


12: El compuesto 11 (5 g, 9,1 mmol) se suspendió en metanol:agua desionizada 95:5 (100 mL) en un matraz agitador PARR de 250 mL al que se añadió Pd-C al 10% (0,13 g, 1,222 mmol) y se hidrogenó a 2,1 kg/cm² (30 psi) de H₂ durante 45 min, añadiendo H₂ periódicamente para restablecer la presión. La solución se filtró a vacío a través de un adyuvante de filtración de celite. El filtrado incoloro claro se concentró por evaporación rotatoria al vacío y después se dejó con vacío durante la noche para dar 2,8 g del producto 12 deseado como un sólido blanco (94% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4,09 - 3,98 (m, 1H), 3,84 (dt, J = 6,1, 3,1 Hz, 1H), 3,79 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 3,75 (ddd, J = 7,5, 4,2, 2,3 Hz, 1H), 3,72 - 3,59 (m, 3H), 3,56 - 3,51 (m, 1H), 3,48 (dd, J = 15,0, 3,6 Hz, 1H), 3,13 (s, 2H), 2,97 (s, 1H), 2,78 - 2,49 (m, 2H), 2,22 - 2,06 (m, 2H). MS (ESI): MS (M - H)⁻ calc. 323,1, encontrado 323,4.



14b: Se añadió el compuesto 13b (1,4, 4,5 mmol) a una solución agitada magnéticamente de 12 (1,4 g, 4,3 mmol) en DMF (10 mL) y DIPEA (1,1 mL, 6,3 mmol). Después de agitar durante 15 min, la reacción se inyectó sobre una columna C18 de 350 g de presión media que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%: acetonitrilo 98:2. La columna se eluyó a 100 mL/min con 2% de acetonitrilo

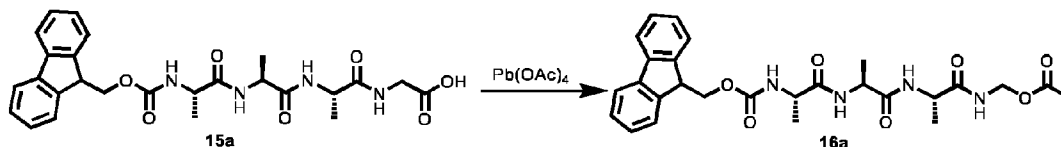
durante 5 min y después con un gradiente lineal de 2% de acetonitrilo a los 5 min a 60% de acetonitrilo a los 35 min detectando a 214 y 306 nm. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 1,3 g del producto deseado 14b en forma de un sólido blanco (58% de rendimiento) MS (M + H)⁺ 518,5, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,03 (dd, *J* = 15,3, 7,7 Hz, 1H), 6,99 (s, 3H), 4,79 (d, *J* = 65,9 Hz, 1H), 4,33 (d, *J* = 30,0 Hz, 1H), 4,22 - 4,07 (m, 1H), 3,75 (p, *J* = 4,2 Hz, 1H), 3,57 (ddt, *J* = 11,4, 6,7, 3,6 Hz, 1H), 3,52 - 3,39 (m, 2H), 3,39 - 3,30 (m, 3H), 3,30 - 3,19 (m, 1H), 2,97 (s, 2H), 2,80 (s, 2H), 2,45 - 2,21 (m, 1H), 2,08 (h, *J* = 3,4 Hz, 2H), 2,01 - 1,85 (m, 1H), 1,76 (qd, *J* = 8,5, 3,9 Hz, 1H), 1,59 - 1,39 (m, 3H), 1,30 - 1,08 (m, 2H).



14a: Se añadió el compuesto 13a (1,4, 5,3 mmol) a una solución agitada magnéticamente de 12 (1,8 g, 5,5 mmol) en DMF (10 mL) y DIPEA (1,1 mL, mmol). Después de agitar durante 15 min, la reacción se inyectó sobre una columna C18 de 350 g de presión media que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%: acetonitrilo 98:2. La columna se eluyó a 100 mL/min con 2% de acetonitrilo durante 5 min y después con un gradiente lineal de 2% de acetonitrilo a los 5 min a 60% de acetonitrilo a los 35 min detectando a 214 y 306 nm. Las fracciones que contenían producto puro se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 1,4 g de 14a como un sólido blanco (55% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,33 (dd, *J* = 9,2, 7,7 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 1,1 Hz, 2H), 4,24 (qd, *J* = 8,8, 4,8 Hz, 1H), 3,86 (dt, *J* = 8,2, 4,0 Hz, 1H), 3,76 - 3,63 (m, 4H), 3,62 - 3,43 (m, 4H), 3,41 - 3,29 (m, 1H), 3,08 (s, 2H), 2,91 (s, 2H), 2,61 (q, *J* = 1,8 Hz, 1H), 2,40 (dd, *J* = 10,0, 6,4 Hz, 1H), 2,02 (tdd, *J* = 12,6, 10,3, 9,1, 5,8 Hz, 1H), 1,93 - 1,76 (m, 1H). MS (ESI): MS (M + H)⁺ calc. 476,2, encontrado 476,4.

Los péptidos protegidos con Fmoc 15a, 15b, 15c y 15d se prepararon por síntesis en fase sólida usando procedimientos convencionales.

Ejemplo 10. Método para convertir Fmoc-péptido-Gly-OH en Fmoc-péptido-NHCH₂OAc (Compuestos 16a-16d)



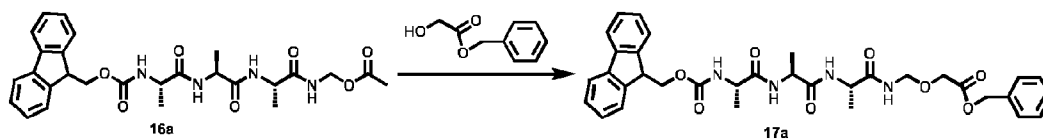
16a: El compuesto 15a (2,5 g, 4,9 mmol) se disolvió en DMF anhidra (40 mL) y se agitó magnéticamente en un matraz de 100 mL y se añadieron acetato de cobre (II) (0,334 g, 1,84 mmol), ácido acético (0,64 mL, 11,1 mmol) y tetraacetato de plomo (2,5 g, 5,6 mmol). El matraz se calentó en un baño de aceite a 60 °C durante 15 min. El baño de aceite se retiró y la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se purificó aproximadamente la 1/2 de la mezcla en una columna C18 de presión media de 350 g que se equilibró con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,3%:acetonitrilo 90:10. La columna se eluyó a 100 mL/min con 10% de acetonitrilo durante 5 min y después con un gradiente lineal de 10% de acetonitrilo desde 5 min hasta 95% de acetonitrilo a los 38 min. Este procedimiento se repitió para la otra 1/2 de mezcla de reacción y las fracciones que contenían el producto deseado 16a se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 1,2 g de semisólido blanco (62% de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,97 (dd, *J* = 16,1, 7,4 Hz, 2H), 7,89 (dt, *J* = 7,6, 0,9 Hz, 2H), 7,72 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,53 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,42 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 2H), 7,33 (td, *J* = 7,5, 1,2 Hz, 2H), 5,13 - 5,01 (m, 2H), 4,30 - 4,17 (m, 4H), 4,06 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 3,32 (s, 1H), 1,99 (s, 3H), 1,27 - 1,13 (m, 9H). MS (ESI): MS (M + Na)⁺ calc. 547,2, encontrado 547,5.

16b se preparó a partir de Fmoc-Ala-Ala-Gly-OH 15b con 55% de rendimiento. MS (M + Na)⁺ 476,7.

16c se preparó a partir de Fmoc-Leu-Gln-Gly-OH 15c con 46% de rendimiento. MS (M + Na)⁺ 575,6.

16d se preparó a partir de Fmoc-Ala-D-Ala-Ala-Gly-OH 15d con 52% de rendimiento. MS (M + Na)⁺ 547,3.

Ejemplo 11. Método para hacer reaccionar 2-hidroxiacetato de bencilo con Fmoc-péptido-NHCH₂OAc (Compuestos 17a-17d)



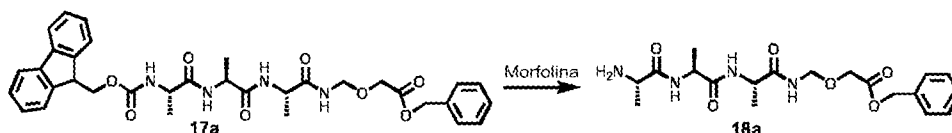
17a: El compuesto 16a (142 mg, 0,27 mmol) y 2-hidroxiacetato de bencilo (226 mg, 1,36 mmol) se suspendieron en una solución de TFA al 20% en diclorometano (7 mL) y se agitaron con agitador magnético a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó en rotavapor al vacío y el residuo se recogió en un volumen mínimo de DMF y después se purificó en una columna C18 de presión media de 200 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%:acetonitrilo 90:10. La columna después se eluyó a 60 mL/min con 10% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 10% de acetonitrilo desde 5 min hasta 95% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 102 mg de sólido blanco 17a (59% de rendimiento). MS (ESI): MS (M + Na)⁺ calc. 653,3, encontrado 653,5.

17b se preparó a partir de 16b con 61% de rendimiento. MS (M + Na)⁺ 582,7.

17c se preparó a partir de 16c con 52% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 659,5.

17d se preparó a partir de 16d con 56% de rendimiento. MS (M + Na)⁺ 653,4.

Ejemplo 12. Conversión de Fmoc-Péptido-NHCH₂OCH₂COOBn en H-Péptido-NHCH₂OCH₂COOBn (Compuestos 18a-18d)



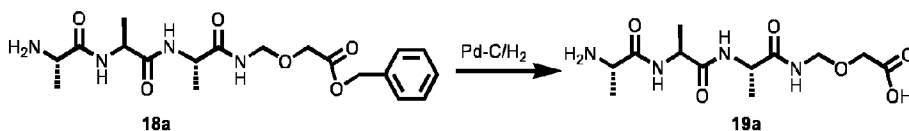
18a: El compuesto 17a (100 mg, 0,16 mmol) se disolvió en DMF (4 mL) a la que se añadió morfolina (0,6 mL, 6,9 mmol) y se agitó magnéticamente. Después de 1 h, la mezcla de reacción se purificó en una columna C18 de presión media de 200 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%:acetonitrilo 95:5. La columna se eluyó a continuación a 60 mL/min con 5% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 5% de acetonitrilo desde 5 min hasta 70% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 50 mg de sólido blanco 18a (76% de rendimiento). MS (ESI): MS (M + H)⁺ calc. 409,2, encontrado 409,6.

18b se preparó a partir de 17b con 80% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 338,3.

18c se preparó a partir de 17c con 61% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 437,6.

18d se preparó a partir de 17d con 61% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 409,6.

Ejemplo 13. Conversión de H-Péptido-NHCH₂OCH₂COOBn en H-Péptido-NHCH₂OCH₂COOH (Compuestos 19a-19d)



19a: En un matraz agitador PARR de 100 mL, se disolvió H-Ala-Ala-Ala-NHCH₂OCH₂COOBn 18a (50 mg, 0,12 mmol) en agua desionizada:metanol 5:95 (50 mL) al que se añadió paladio sobre carbono al 10% (0,1 g) y la reacción se hidrogenó en un agitador PARR a 2,1 kg/cm² (30 psi) de H₂ durante 1 h. La solución se filtró al vacío a través de un adyuvante de filtración de celite y el disolvente se separó del filtrado por evaporación rotatorio al vacío para dar 35 mg del producto deseado 19a como un aceite espeso (91% de rendimiento). MS (ESI): MS (M + H)⁺ calc. 319,2, encontrado 319,3.

19b se preparó a partir de 18b con 92% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 248,3.

19c se preparó a partir de 18c con 83% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 347,4.

19d se preparó a partir de 18d con 81% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 319,5.

Ejemplo 14. Método para preparar compuestos Mal-(CH₂)₅-CO-péptidoNHCH₂OCH₂COOH (Compuestos 20a-20d)

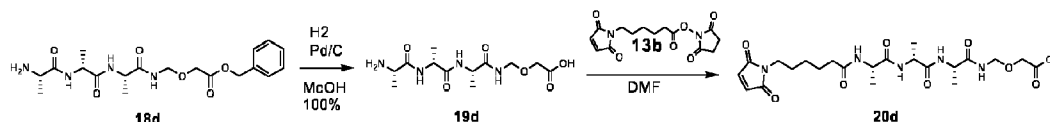
No se puede mostrar la imagen vinculada. Puede que se haya movido, cambiado de nombre o eliminado el archivo. Compruebe que el vínculo señala al archivo y ubicaciones correctas.

5

20a: Se disolvió Mal-(CH₂)₅-COONHS **13b** (46 mg, 0,15 mmol) en DMF anhidra (2 mL) a la que se añadió DIPEA (0,1 mL, 0,31 mmol) y H-Ala-Ala-Ala-NHCH₂OCH₂COOH **19a** (30 mg, 0,093 mmol). La reacción se agitó magnéticamente durante 15 min y después se purificó en una columna C18 de presión media de 50 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%:acetonitrilo 95:5. La columna se eluyó a continuación a 40 mL/min con 5% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 5% de acetonitrilo desde 5 min hasta 90% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 30 mg de sólido blanco **20a** (63% de rendimiento). MS (ESI): MS (M - H)⁻ calc. 510,2, encontrado 510,1, RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,16 (s, 1H), 8,64 - 8,48 (m, 1H), 7,97 (dd, *J* = 7,3, 3,2 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,00 (s, 2H), 4,3 - 4,7 (m, 4H), 4,21 (dt, *J* = 10,3, 7,2 Hz, 4H), 3,55 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,37 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,41 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,08 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,47 (p, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,27 - 1,10 (m, 6H).

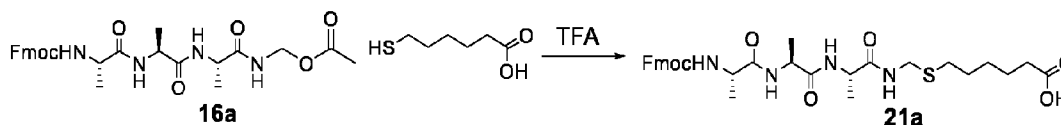
20b se preparó a partir de **19b** con 83% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 441,4.

20 **20c** se preparó a partir de **19c** con 83% de rendimiento. MS (M - H)⁻ 655,4.



25 **20d**: A una solución del compuesto **18d** (99,7 mg, 0,24 mmol) en metanol (3 mL) se añadió Pd (10% sobre carbono, 26 mg, 0,024 mmol) y el matraz de reacción se purgó con hidrógeno. Se hidrogenó con un balón de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas y después se filtró. Se separaron los componentes volátiles del filtrado para dar el compuesto **19d** como un sólido blanco (78 mg, 100% de rendimiento). Se recogieron 41,9 mg (0,13 mmol) y se disolvieron en DMF anhidra (0,5 mL) y se añadió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 6-maleimido hexanoico **13b** (40,6 mg, 0,13 mmol). La solución transparente incolora obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se separaron los componentes volátiles a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 y se eluyó con CH₃CN/H₂O, de 10 a 50% de CH₃CN en 15 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar el compuesto **20d** (30,8 mg, rendimiento 45%). MS (ESI): *m/z* 512,4 (M + H)⁺, 510,4 (M - H)⁻.

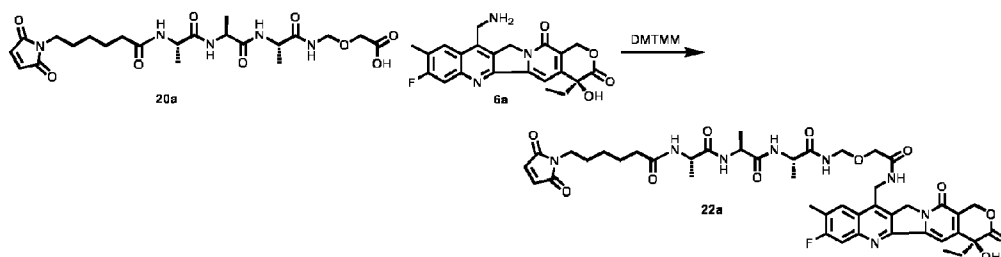
35 **Ejemplo 15. Síntesis de compuestos 21a y 21b**



40 **21a**: El compuesto **16a** (300 mg, 0,57 mmol) y ácido 6-mercaptohexanoico (254 mg, 1,7 mmol) se suspendieron en una solución de TFA al 20% en diclorometano (10 mL) y se agitaron con agitador magnético a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó por evaporación rotatoria al vacío y el residuo se recogió en un volumen mínimo de DMF y después se purificó en una columna C18 de presión media de 200 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1 %:acetonitrilo 95:5. La columna después se eluyó a 60 mL/min con 10% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 5% de acetonitrilo desde 5 min hasta 95% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 202 mg de sólido blanco **21a** (58% de rendimiento). MS (M + Na)⁺ 613,9.

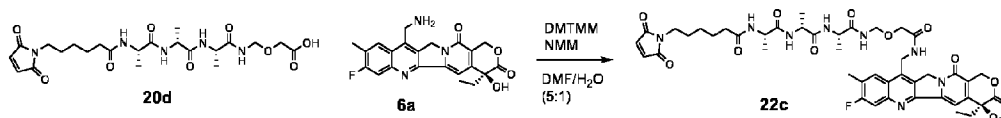
50 **21b** se preparó de manera similar a **21a** a partir de **16d** y ácido 6-mercaptohexanoico con 60% de rendimiento. MS (M + H)⁺ 613,7.

Ejemplo 16. Síntesis del compuesto 22a



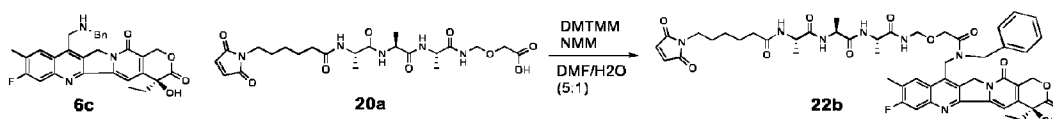
22a: El compuesto 6a (20 mg, 0,049 mmol) y DMTMM (18 mg, 0,065 mmol) en DMF:agua desionizada 85:15 (0,8 mL) se agitaron con agitador magnético a medida que se añadían 20a (35 mg, 0,068 mmol) y TEA (0,04 mL, 0,28 mmol) secuencialmente. Después de 1 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna de sílice de presión media de 50 g que se equilibró con diclorometano y se usó a 30 mL/min con diclorometano usando un gradiente lineal de 0% a 100% de metanol al 20% en diclorometano durante 40 min. Las fracciones que contenían producto puro se combinaron y el disolvente se separó por evaporación rotatoria a vacío para dar 16 mg de un sólido marrón 22a (36% de rendimiento). MS (M + Na)⁺ 925,6. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0,88 (t, J = 7,3 Hz, 3H), 1,11 - 1,23 (m, 15H), 1,46 (p, J = 7,3 Hz, 5H), 1,79 - 1,95 (m, 2H), 2,07 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,04 - 3,16 (m, 2H), 3,88 (s, 2H), 4,18 (dd, J = 7,1, 11,0 Hz, 2H), 4,50 - 4,65 (m, 2H), 4,86 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 5,44 (s, 2H), 5,49 (s, 2H), 6,53 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,91 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 7,97 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 8,43 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,65 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 8,73 (t, J = 5,9 Hz, 1H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) δ 180,20, 173,96, 172,96, 172,89, 172,56, 172,36, 171,54, 170,03, 163,99, 157,27, 156,21, 152,90, 150,48, 145,85, 139,87, 134,92, 129,28, 128,06, 124,24, 119,65, 97,28, 72,84, 70,18, 67,29, 65,74, 50,53, 48,81, 48,68, 48,60, 46,26, 41,01, 37,44, 35,26, 30,71, 28,24, 26,23, 25,09, 18,33, 18,24, 18,18, 15,77, 15,74, 9,12, 8,21. HRMS (M + H)⁺ calc. 903,3688, encontrado 903,3676.

Ejemplo 17. Síntesis del compuesto 22c



22c: A la solución de 6a (8 mg, 0,02 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadieron NMM (2,2 μL, 0,02 mmol) y el compuesto 20d (10 mg, 0,02 mmol). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (10,8 mg, 0,04 mmol) en agua desionizada (0,1 mL). Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño a 35 °C) y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos después a 95% de CH₃CN en 12 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos). Las fracciones de producto se combinaron y liofilizaron para dar un sólido blanco. Se purificó adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (columna de 4 g de sílice, CH₂Cl₂/MeOH, MeOH de 0 a 20% en 15 minutos) para dar el producto deseado 22c (9,8 mg, 55% de rendimiento). MS (ESI): m/z 903,9 (M + H)⁺, 901,9 (M - H)⁻, 947,9 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 18. Síntesis del compuesto 22b

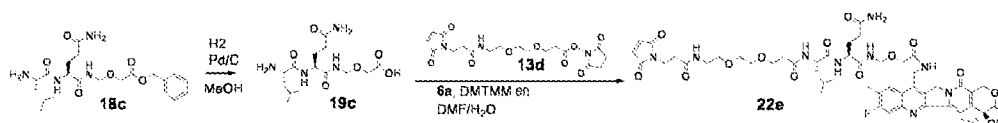


22b: A la solución de 6c (10,7 mg, 0,022 mmol) en DMF (0,5 mL) se añadieron NMM (2,4 μL, 0,022 mmol) y el compuesto 20a (11 mg, 0,022 mmol). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (11,9 mg, 0,043 mmol) en agua desionizada (0,1 mL). Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño a 35 °C) y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos después a 95% de CH₃CN en 12 minutos y después 95% de CH₃CN durante 5 minutos) para dar el producto deseado 22b (4 mg, 18% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1015,9 (M + Na)⁺, 991,9 (M - H)⁻, 1037,9 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 19. Síntesis del compuesto 22d

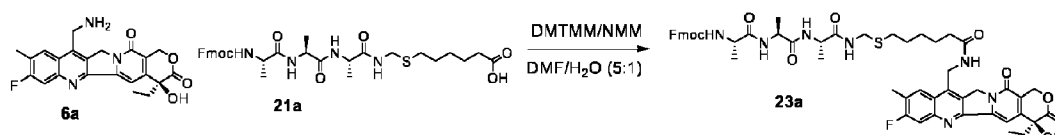
22d: Preparado de manera similar a 22c por reacción de 6c con 20d (22% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1015,8 (M + Na)⁺

Ejemplo 20. Síntesis del compuesto 22e



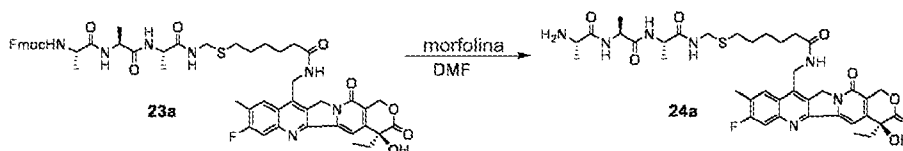
- 5 22e: A la solución del compuesto 18c (15,2 mg, 0,035 mmol) en metanol (2 mL) se añadió Pd (al 10% sobre carbono, 3,7 mg, 0,0035 mmol) y el matraz de reacción se purgó con hidrógeno. Se hidrogenó con un balón de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas y después se filtró. Se separaron los componentes volátiles del filtrado para dar el compuesto 19c en forma de una espuma incolora. Se disolvió en DMF anhidra (0,3 mL) y se añadió 13d (15,9 mg, 0,03 mmol). La solución transparente incolora obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. Se diluyó con DMF (0,2 mL) seguido de la adición de 6a (15,3 mg, 0,037 mmol) y NMM (4,1 μ L, 0,037 mmol). Después se añadió DMTMM (20,7 mg, 0,075 mmol) en agua desionizada (0,1 mL) y la solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se separaron los componentes volátiles de la mezcla de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, de 0 a 20% de MeOH) para dar el 22e deseado (10 mg, 26% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1049,1 ($\text{M} + \text{H}^+$), 1093,2 ($\text{M} + \text{HCOOH} - \text{H}^+$).

Ejemplo 21. Síntesis del compuesto 23a



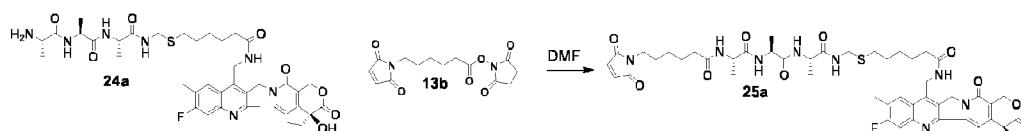
- 20 23a: A la solución de 6a (32 mg, 0,078 mmol) en DMF (0,8 mL) se le añadió NMM (8,6 μ L, 0,078 mmol) y el enlazador tripeptídico L-Ala-L-Ala-L-Ala protegido con Fmoc 21a (53 mg, 0,078 mmol) seguido por la adición de DMTMM (43 mg, 0,156 mmol) en agua desionizada (0,16 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de 4 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos) para dar el compuesto deseado 23a (78 mg, 99% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1004,5 ($\text{M} + \text{H}^+$), 1026,6 ($\text{M} + \text{Na}^+$), 1048,4 ($\text{M} + \text{HCOOH} - \text{H}^+$).

Ejemplo 22. Síntesis del compuesto 24a



- 35 24a: A la solución del compuesto 23a (78 mg, 0,078 mmol) en DMF anhidra (1 mL) se le añadió morfolina (0,24 mL, 2,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 4 g, eluida con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, de 0 a 20% de MeOH en 9 minutos y después 20% de MeOH durante 11 minutos) para dar el compuesto deseado 24a (39,6 mg, 65% de rendimiento). MS (ESI): m/z 782,4 ($\text{M} + \text{H}^+$), 780,0 ($\text{M} - \text{H}^+$).

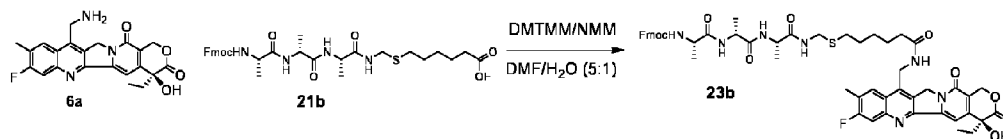
Ejemplo 23. Síntesis del compuesto 25a



- 45 25a: A la solución del compuesto 24a (20 mg, 0,026 mmol) en DMF anhidra (0,3 mL) se añadió 13b (9,6 mg, 0,031 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La solución de reacción se diluyó con DMSO y se purificó por HPLC semipreparativa de fase inversa (columna C18, eluida con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, de 25% a 55% de CH_3CN en 23 minutos y después 95% de CH_3CN durante 7 minutos). Las fracciones que contenían 25a se combinaron y liofilizaron para dar 25a como un sólido blanco. Se purificó adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (columna de 4 g de sílice, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos) para dar el 25a deseado (7,7 mg, 30% de rendimiento). MS (ESI): m/z 975,8 ($\text{M} + \text{H}^+$),

997,8 (M + Na)⁺, 773,7 (M - H)⁻, 1019,7 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 24. Síntesis del compuesto 23b

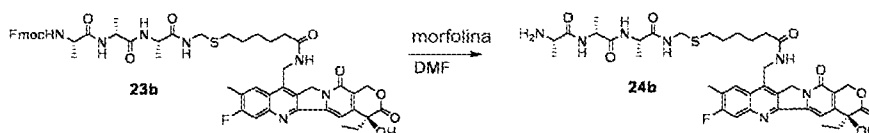


5

23b: A una solución de 6a (31 mg, 0,076 mmol) en DMF (0,8 mL) se añadieron NMM (8,3 μ L, 0,076 mmol) y 21b (46,4 mg, 0,076 mmol). La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadió DMTMM (48 mg, 0,16 mmol) en agua desionizada (0,16 mL). Se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 4 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos) para dar el compuesto producto deseado 23b (31 mg, 40% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 1004,6 (M + H)⁺, 1048,7 (M + HCOOH - H)⁻.

10

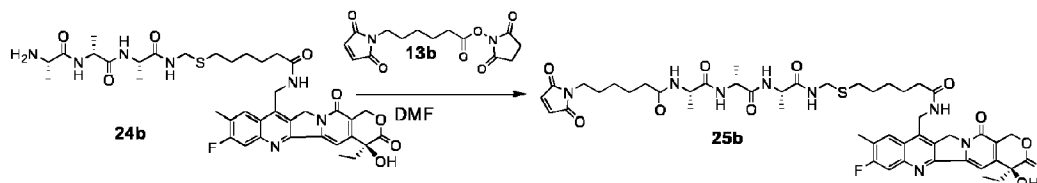
15 Ejemplo 25. Síntesis del compuesto 24b



24b: A una solución de 23b (31 mg, 0,031 mmol) en DMF anhidra (0,4 mL) se añadió morfolina (95 μ L, 1,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de sílice de 4 g, eluida con CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos y después 20% de MeOH durante 5 minutos) para dar el compuesto deseado 24b (18 mg, 75% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 782,5 (M + H)⁺, 780,2 (M - H)⁻, 826,4 (M + HCOOH - H)⁻.

25

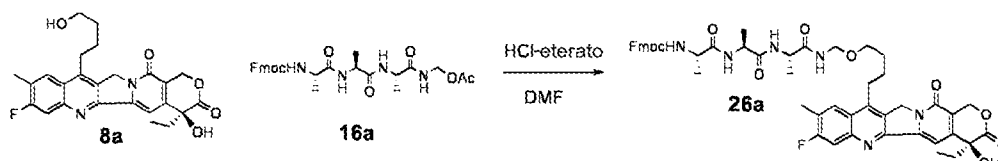
Ejemplo 26. Síntesis del compuesto 25b



25b: A una solución de 24b (12,3 mg, 0,016 mmol) en DMF anhidra (0,3 mL) se le añadió éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 5-maleimidohexanoico 13b (7,3 mg, 0,024 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (columna de 4 g, CH₂Cl₂/MeOH, de 0 a 20% de MeOH en 15 minutos) para dar 3,2 mg de 25b y otros 6,5 mg de producto impuro. El producto impuro se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa semipreparativa (columna C18, eluida con CH₃CN/H₂O, de 25% a 55% de CH₃CN en 23 minutos y después 95% de CH₃CN durante 7 minutos para dar 2,8 mg de 25b. En total se aislaron 6 mg de 25b (39% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 975,6 (M + H)⁺, 997,6 (M + Na)⁺, 973,7 (M - H)⁻, 1019,6 (M + HCOOH - H)⁻.

35

40 Ejemplo 27. Síntesis del compuesto 26a



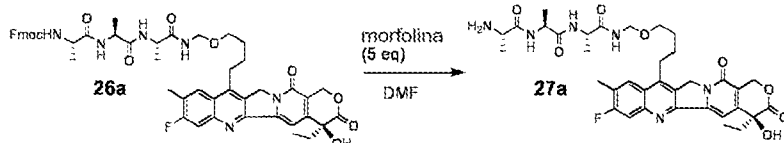
26a: A una solución en agitación de 8a (58 mg, 0,106 mmol) y el compuesto 16a (55,8 mg, 0,106 mmol) en DMF anhidra (1,5 mL) se le añadió HCl-eterato (solución de HCl-éter dietílico 2 M, 64 μ L, 0,128 mmol). Después de agitar 22 horas a temperatura ambiente, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño de calentamiento a 35 °C). El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna

45

C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos después hasta 90% de CH₃CN en 12 minutos y después 90% de CH₃CN durante 3 minutos) para dar el compuesto 26a como un sólido blanco (47 mg, 48% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* calc. 917,4, encontrado 917,6 (M + H)⁺, 961,5 (M + HCOOH - H)⁻. También se recuperó 8a sin reaccionar (12 mg).

5

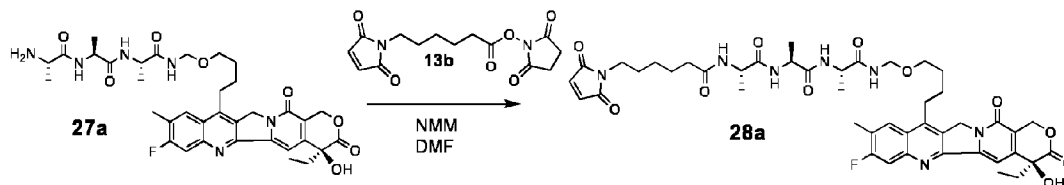
Ejemplo 28. Síntesis del compuesto 27a



- 10 27a: A una solución en agitación del compuesto 26a (57 mg, 0,062 mmol) en DMF anhidra (0,8 mL) se le añadió morfolina (27 μ L, 0,31 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 6 horas, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g y se eluyó con CH₃CN/H₂O, 20% de CH₃CN durante 3 minutos después a 90% de CH₃CN en 15 minutos y después 90% de CH₃CN durante 3 minutos) para dar el compuesto 27a como un sólido blanquecino (35,9 mg, 83% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 695,5 (M + H)⁺, 739,3 (M + HCOOH - H)⁻.

15

Ejemplo 29. Síntesis del compuesto 28a



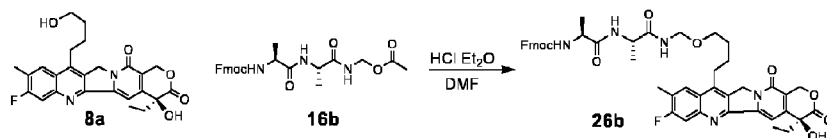
20

- 25 28a: A una solución del compuesto 27a (18 mg, 0,026 mmol) en DMF anhidra (0,3 mL) se le añadieron éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 5-maleimido-hexanoico 13b (12 mg, 0,039 mmol) y NMM (3,1 μ L, 0,028 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 horas, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, eluida con CH₃CN/H₂O, duración de 18 minutos, 20% de CH₃CN durante 3 minutos, después de 20% a 90% de CH₃CN en 12 minutos y después 90% de CH₃CN durante 3 minutos) para dar el producto 28a como un sólido blanco (11,9 mg, 51% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 888,5 (M + H)⁺, 932,5 (M + HCOOH - H)⁻. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,45 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,90 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,78 (dd, *J* = 15,2, 9,1 Hz, 2H), 7,22 (s, 1H), 6,92 (s, 2H), 6,45 (s, 1H), 5,36 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 4,54 - 4,38 (m, 2H), 4,15 - 4,09 (m, 2H), 3,38 - 3,33 (m, 1H), 3,32 - 3,21 (m, 1H), 3,15 - 3,06 (m, 1H), 2,50 - 2,42 (m, 3H), 1,99 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,79 (h, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,67 - 1,55 (m, 6H), 1,38 (p, *J* = 7,4 Hz, 5H), 1,15 - 1,04 (m, 12H), 0,81 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,54, 173,86, 171,34, 171,26, 170,84, 170,79, 170,47, 170,15, 161,42, 158,95, 155,71, 155,16, 150,43, 148,38, 146,97, 146,80, 144,22, 142,23, 129,03, 126,25, 125,69, 125,48, 124,98, 124,50, 122,77, 122,48, 117,29, 111,01, 110,78, 95,09, 70,75, 70,67, 67,55, 65,17, 63,64, 48,03, 46,55, 33,20, 28,68, 27,46, 26,96, 25,04, 24,55, 24,05, 23,06, 22,84, 16,39, 16,14, 13,54, 6,13, 5,98; HRMS (M + H)⁺ calc. 888,3943, encontrado 888,3966.

30

35

Ejemplo 30. Síntesis del compuesto 26b

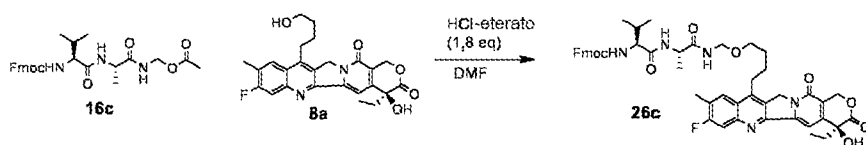


40

- 45 26b: A una solución en agitación de 8a (73 mg, 0,14 mmol) y el compuesto 16b (64 mg, 0,14 mmol) en DMF anhidra (1,2 mL) se le añadió HCl-eterato (solución de HCl-éter dietílico 2 M, 0,14 mL, 0,28 mmol). Después de agitar 6 h a temperatura ambiente, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño de calentamiento a 35 °C). El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos después hasta 90% de CH₃CN en 12 min y después 90% de CH₃CN durante 3 min) para dar el compuesto 26b como un sólido blanquecino (60 mg, 50% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 846,4 (M + H)⁺, 890,3 (M + HCOOH - H)⁻.

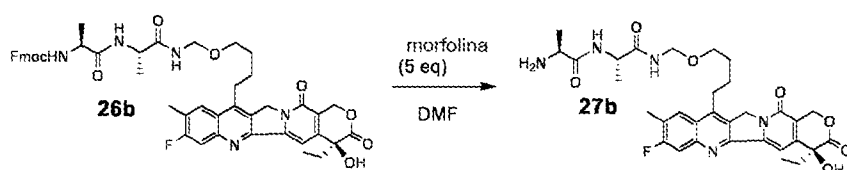
50

Ejemplo 31. Síntesis del compuesto 26c



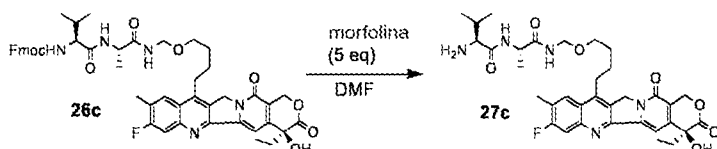
26c: A una solución en agitación de 8a (36 mg, 0,08 mmol) y 16c (40,2 mg, 0,084 mmol) en DMF anhidra (0,6 mL) se le añadió HCl-eterato (solución de HCl-éter dietílico 2 M, 72 μ L, 0,43 mmol). Después de agitar 15 h a temperatura ambiente, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (baño de calentamiento a 35 $^{\circ}$ C). El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 25% de CH₃CN durante 3 minutos después hasta 95% de CH₃CN en 12 min y después 95% de CH₃CN durante 3 min) para dar el compuesto 26c como un sólido blanco (41,9 mg, 60% de rendimiento). MS (ESI): m/z 874,4 (M + H)⁺, 918,5 (M + HCOOH - H)⁻. También se recuperó 8a sin reaccionar (12 mg).

Ejemplo 32. Síntesis del compuesto 27b



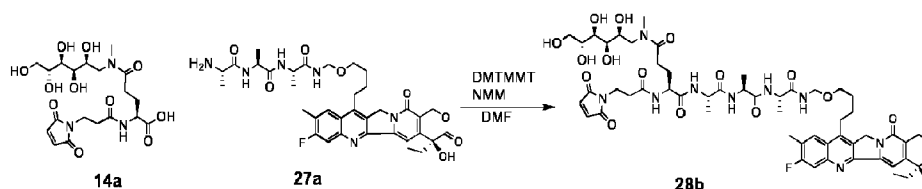
27b: A una solución en agitación del compuesto 26b (60 mg, 0,071 mmol) en DMF anhidra (0,4 mL) se añadió morfolina (31 μ L, 0,36 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 3,5 horas, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 15,5 g y se eluyó con CH₃CN/H₂O, 10% de CH₃CN durante 3 minutos después a 90% de CH₃CN en 9 minutos y después 90% de CH₃CN durante 3 minutos) para dar el compuesto 27b como un sólido blanquecino (36,7 mg, 83% de rendimiento). MS (ESI): m/z 624,5 (M + H)⁺, 668,3 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 33. Síntesis del compuesto 27c



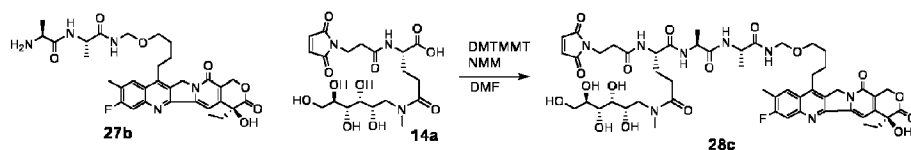
27c: A una solución en agitación del compuesto 26c (41,9 mg, 0,048 mmol) en DMF anhidra (0,4 mL) se le añadió morfolina (21 μ L, 0,24 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 h, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g y se eluyó con CH₃CN/H₂O, 20% de CH₃CN durante 3 minutos después a 90% de CH₃CN en 12 min y después 90% de CH₃CN durante 5 min) para dar el compuesto 27c como un sólido blanco (25,5 mg, 82% de rendimiento). MS (ESI): m/z 652,5 (M + H)⁺, 650,2 (M - H)⁻, 696,2 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 34. Síntesis del compuesto 28b



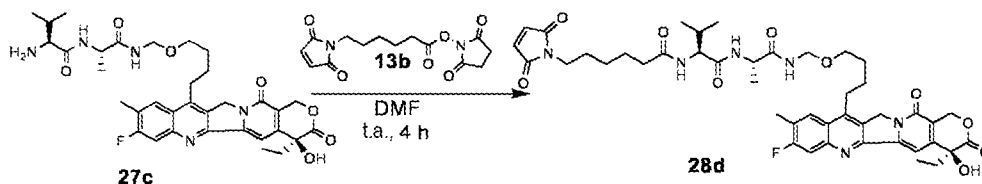
28b: A una solución en agitación del compuesto 27a (18 mg, 0,026 mmol) y 14a (18,5 mg, 0,039 mmol) en DMF anhidra (0,2 mL) se añadieron DMTMM (17 mg, 0,052 mmol) y NMM (2,9 μ L, 0,026 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 19 h, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida (temperatura de baño 35 $^{\circ}$ C) y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, CH₃CN/H₂O, 20% de CH₃CN durante 3 minutos después a 90% de CH₃CN en 12 min y después 90% de CH₃CN durante 3 min). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y liofilizaron para dar 28b como un sólido blanco (2,3 mg, 7% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1152,5 (M + H)⁺, 1150,0 (M - H)⁻, 1196,5 (M + HCOOH - H)⁻.

Ejemplo 35. Síntesis del compuesto 28c



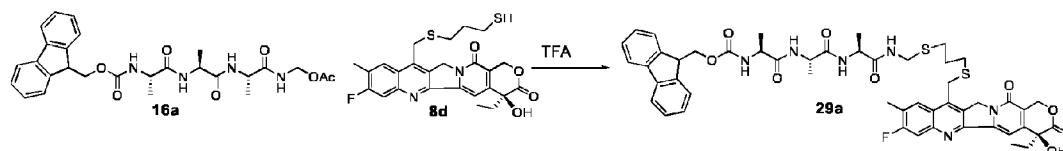
- 5 28c: A una solución en agitación de 27b (36,7 mg, 0,059 mmol) y 14a (42 mg, 0,088 mmol) en DMF anhidra (0,6 mL) se le añadieron DMTMM (39 mg, 0,12 mmol) y NMM (3,2 μ L, 0,029 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 h, la solución de reacción se cargó directamente en un cartucho C18 y se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 20% de CH_3CN durante 3 minutos después a 90% de CH_3CN en 12 min y después 90% de CH_3CN durante 3 min). Las
- 10 fracciones que contenían el producto se combinaron y liofilizaron para dar 28c como un sólido blanco (9,9 mg, 15% de rendimiento). MS (ESI): m/z 1081,5 ($\text{M} + \text{H}^+$), 1079,2 ($\text{M} - \text{H}^-$), 1025,5 ($\text{M} + \text{HCOOH} - \text{H}^-$).

Ejemplo 36. Síntesis del compuesto 28d



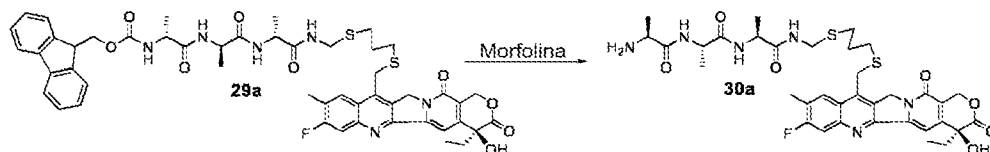
- 15 28d: A la solución de 27c (10,5 mg, 0,016 mmol) en DMF anhidra (0,2 mL) se añadieron éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 5-maleimido-hexanoico 13b (6 mg, 0,019 mmol) y NMM (2,1 μ L, 0,019 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 4 h, se separaron los componentes volátiles de la solución de reacción a presión reducida. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 de 30 g, eluida con $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, duración de 18 minutos, 20% de CH_3CN durante 3 minutos, después de 20% a 90% de CH_3CN en 12 minutos y después 90% de CH_3CN durante 3 minutos) para dar el producto 28d como un sólido blanco (8,7 mg, 63% de rendimiento). MS (ESI): m/z 845,4 ($\text{M} + \text{H}^+$), 989,4 ($\text{M} + \text{HCOOH} - \text{H}^-$).
- 20

Ejemplo 37. Síntesis del compuesto 29a



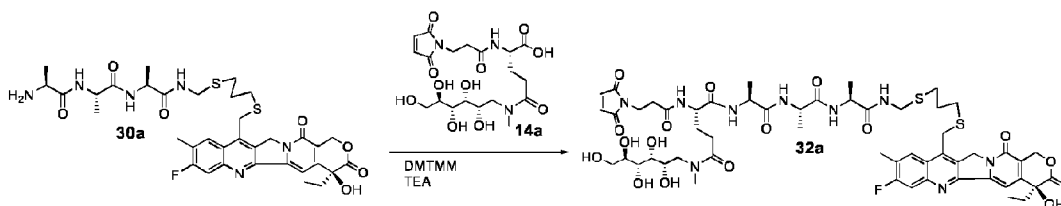
- 29a: El compuesto 16a (30 mg, 0,057 mmol) y 8d (50 mg, 0,1 mmol) se suspendieron en una solución de TFA al 20% en diclorometano (10 mL) y se agitaron con agitador magnético a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó en rotavapor al vacío y el residuo se recogió en un volumen mínimo de DMF y después se purificó en una columna C18 de presión media de 100 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%:acetonitrilo 90:10. La columna se eluyó a continuación a 30 mL/min con 10% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 10% de acetonitrilo desde 5 min a 95% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 31 mg de sólido blanco 29a (56% de rendimiento). MS ($\text{M} + \text{Na}^+$) 987,5.
- 30
- 35

Ejemplo 38. Síntesis del compuesto 30a



- 40 30a: El compuesto 29a (28 mg, 0,029 mmol) se disolvió en DMF anhidra (0,8 mL) y se agitó magnéticamente a medida que se añadía morfolina (0,2 mL). Después de 1 h, la mezcla de reacción se cargó directamente en un cartucho C18 de 100 g de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 25:75, se llevó a cabo el análisis a 50 mL/min con 25% de CH_3CN durante 3 minutos, después con un gradiente lineal a 90% de CH_3CN de 3 - 23 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 18 mg (83% de rendimiento) de 30a como un sólido amarillo. MS ($\text{M} + \text{H}^+$) 743,5.
- 45

Ejemplo 39. Síntesis del compuesto 32a



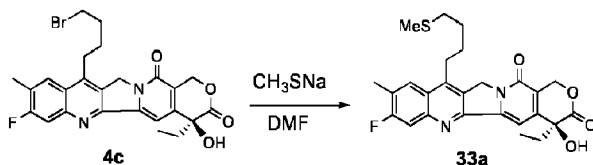
5

32a: El compuesto 30a (16 mg, 0,02 mmol) se disolvió en DMF:agua desionizada 84:16 (0,5 mL) a lo que se añadieron rápidamente DMTMM (15 mg, 0,054 mmol), TEA (0,02 mL, 0,14 mmol) y 14a (20 mg, 0,042 mmol) y se agitaron con agitador magnético. Después de 35 min, la mezcla de reacción se cargó en un cartucho de sílice de 100 g equilibrado previamente con diclorometano y después se realizó el análisis a 35 mL/min con un gradiente lineal de 0% a 100% a lo largo de 30 min de metanol:diclorometano 40:60. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se evaporó al vacío para dar 7 mg (29% de rendimiento) de 32a como un aceite espeso. MS (M + Na)⁺ 1223,0.

10

Ejemplo 40. Síntesis del compuesto 33a

15

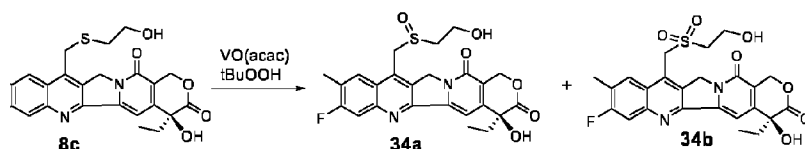


33a: A una solución de 4c (11 mg, 0,021 mmol) en DMF anhidra (0,2 mL) se le añadió tiometóxido sódico (3,6 mg, 0,052 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución de reacción se cargó directamente en un cartucho C18 de 30 g de CH₃CN/H₂O 25:75, se llevó a cabo el análisis a 20 mL/min con 25% de CH₃CN durante 3 minutos y después con un gradiente lineal a 90% de CH₃CN de 3-12 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron al vacío para dar el compuesto 33a como un sólido blanco (3,1 mg, 30% de rendimiento). MS (ESI): *m/z* 483,4 (M + H)⁺, 481,3 (M - H)⁻.

20

25

Ejemplo 41. Síntesis del compuesto 34a y compuesto 34b



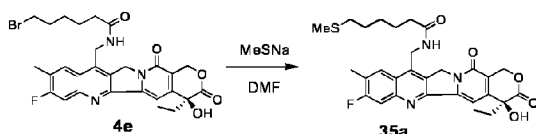
30

34a y 34b: El compuesto 8c (30 mg, 0,064 mmol) se agitó magnéticamente en DMF (1 mL) y se le añadieron acetilacetato de vanadio (3 mg, 0,008 mmol) y una solución de hidropéroxido de terc-butilo 5 M en decano (0,05 mL, 0,25 mmol). Después de 5 min, la solución se cargó directamente en un cartucho C18 de 30 g de CH₃CN/H₂O 25:75, se llevó a cabo el análisis a 20 mL/min con 25% de CH₃CN durante 3 minutos y después con un gradiente lineal a 90% de CH₃CN de 3-12 min. Las fracciones que contenían 34a puro se combinaron por separado de las fracciones que contenían 34b puro y ambas se congelaron y liofilizaron por separado para dar 6 mg de 34a (19% de rendimiento) y 15 mg de 34b (47% de rendimiento), ambos como sólidos amarillos. 34a MS (M + H)⁺ 487,4, 34b MS (M + H)⁺ 503,6.

35

Ejemplo 42. Síntesis del compuesto 35a

40

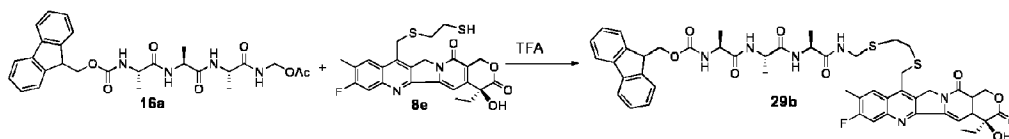


35a: A una solución del compuesto 4e (17 mg, 0,025 mmol) en DMF anhidra (0,3 mL) se le añadió tiometóxido sódico (7 mg, 0,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución de reacción se diluyó con DMSO y se inyectó en la HPLC semi-preparativa para purificación (columna C18, CH₃CN/H₂O, de 25% a 65% de CH₃CN en 23 minutos) para dar el producto deseado 35a (2,7 mg, 19% de

45

rendimiento). MS (ESI): m/z 554,4 ($M + H$)⁺, 552,5 ($M - H$)⁻.

Ejemplo 43. Síntesis del compuesto 29b



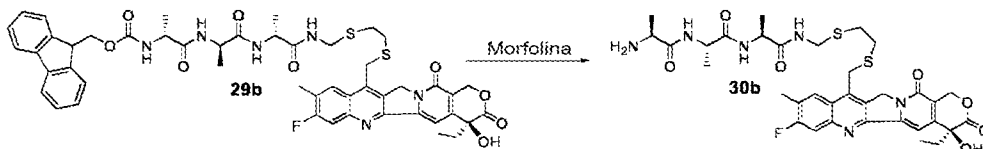
5

29b: El compuesto 16a (30 mg, 0,057 mmol) y 8e (50 mg, 0,1 mmol) se suspendieron en una solución de TFA al 20% en diclorometano (10 mL) y se agitaron con agitador magnético a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó en rotavapor al vacío y el residuo se recogió en un volumen mínimo de DMF y después se purificó en una columna C18 de presión media de 100 g que se equilibró previamente con agua desionizada que contenía ácido fórmico al 0,1%:acetonitrilo 90:10. La columna se eluyó a continuación a 30 mL/min con 10% de acetonitrilo durante 5 min seguido de un gradiente lineal de 10% de acetonitrilo desde 5 min hasta 95% de acetonitrilo a los 38 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 31 mg de sólido blanco 29b (56% de rendimiento). MS (ESI): MS ($M + Na$)⁺ calc. 973,3, encontrado 973,7.

10

15

Ejemplo 44. Síntesis del compuesto 30b



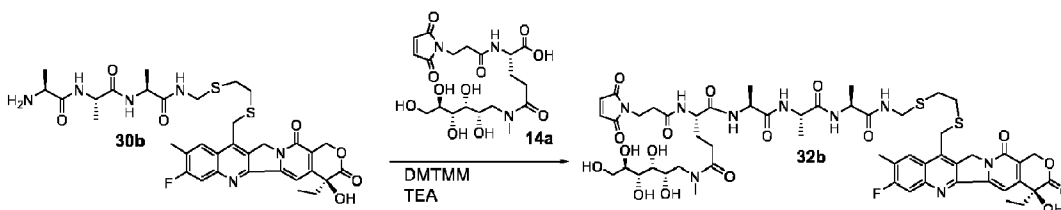
20

30b: El compuesto 29b (28 mg, 0,029 mmol) se disolvió en DMF anhidra (0,8 mL) y se agitó magnéticamente a medida que se añadía morfolina (0,2 mL, 2,32 mmol). Después de 1 h, la mezcla de reacción se cargó directamente en un cartucho C18 de 100 g de CH₃CN/H₂O 25:75, se realizó el análisis a 50 mL/min con 25% de CH₃CN durante 3 min, después con un gradiente lineal a 90% de CH₃CN de 3-23 min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 18 mg (83% de rendimiento) de 30b como un sólido amarillo. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,52 (t, J = 6,3 Hz, 1H), 8,31 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 8,11 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,87 (t, J = 9,1 Hz, 2H), 7,69 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,37 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,31 (t, J = 3,7 Hz, 2H), 5,43 (s, 2H), 5,31 (s, 2H), 4,47 (d, J = 2,6 Hz, 2H), 4,32 - 4,09 (m, 4H), 3,69 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,36 (q, J = 6,9 Hz, 1H), 2,84 (s, 4H), 2,61 - 2,54 (m, 3H), 2,46 - 2,42 (m, 4H), 1,94 - 1,75 (m, 2H), 1,17 (dd, J = 7,2, 3,4 Hz, 6H), 1,12 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H). MS (ESI): MS ($M + H$)⁺ calc. 729,3, encontrado 729,4.

25

30

Ejemplo 45. Síntesis del compuesto 32b



35

32b: El compuesto 30b (16 mg, 0,02 mmol) se disolvió en DMF:agua desionizada 84:16 (0,5 mL) a lo que se añadieron rápidamente DMTMM (15 mg, 0,054 mmol), TEA (0,02 mL, 0,14 mmol) y 14a (20 mg, 0,042 mmol) y se agitaron con agitador magnético. Después de 35 min, la mezcla de reacción se cargó en un cartucho de sílice de 100 g equilibrado previamente con diclorometano y después se realizó el análisis a 35 mL/min con un gradiente lineal a lo largo de 30 min de 0% a 100% de metanol: diclorometano 40:60. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y el disolvente se evaporó al vacío para dar 7 mg de 32b (29 % de rendimiento) como un aceite espeso. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,86 - 7,83 (m, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,69 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,51 - 7,47 (m, 2H), 7,28 (t, J = 1,0 Hz, 1H), 6,61 (s, 2H), 5,59-5,53 (m, 1H), 5,40 (dd, J = 3,3, 1,1 Hz, 2H), 5,29-5,26 (m, 2H), 4,72 (s, 2H), 4,52-4,46 (m, 1H), 4,38 (s, 1H), 4,35 (dd, J = 3,5, 1,8 Hz, 2H), 4,28-4,22 (m, 2H), 4,21 - 4,13 (m, 2H), 3,74 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 3,70 (ddd, J = 11,9, 5,7, 4,8 Hz, 1H), 3,60 - 3,51 (m, 2H), 3,44 (dd, J = 11,9, 4,9 Hz, 1H), 3,3 (s ancho, 8H), 3,20 (dd, J = 4,7, 3,7 Hz, 2H), 2,91 (s, 3H), 2,89 (s, 3H), 2,56 (td, J = 6,4, 1,7 Hz, 2H), 2,31 (s, 3), 2,37 - 2,21 (m, 2H), 2,07 - 1,82 (m, 3H), 1,72 (dq, J = 13,7, 8,1 Hz, 1H), 1,53 (d, J = 5,5 Hz, 6H), 1,45 (d, J = 5,9 Hz, 3H), 0,86 (t, J = 8,0 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174,75, 174,58, 172,85, 172,75, 172,45, 171,62, 171,37, 169,30, 163,44, 160,52, 157,18, 149,96, 148,73, 147,39, 147,32, 142,26, 132,98, 131,74, 127,54, 127,38, 127,24, 126,88,

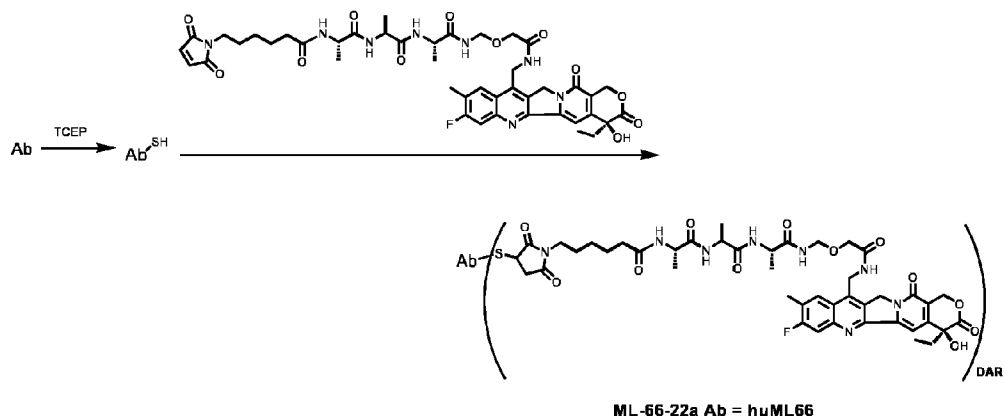
40

45

50

124,90, 124,84, 124,34, 122,88, 118,32, 116,83, 116,67, 97,97, 74,87, 73,80, 72,41, 72,34, 69,44, 65,10, 62,94, 53,02, 50,02, 49,92, 49,62, 48,46, 45,53, 42,38, 40,85, 35,32, 35,13, 34,00, 32,31, 32,24, 30,20, 26,63, 20,49, 17,81, 17,71, 17,61, 7,68. HRMS (M + H)⁺ calc. 1186,4237, encontrado 1186,4220.

5 Ejemplo 46. Método general para la preparación de conjugados



10 Se generaron anticuerpos IgG1 humanizados tales como anti-factor de crecimiento epidérmico (ML66), anti-receptor de folato α (FR α) y el anticuerpo quimérico que se une al inhibidor de tripsina de soja Kunitz (KTI). La conjugación de anticuerpos a cargas activas que llevan maleimida se realizó como se describe para la preparación de ML66-22a. Los conjugados resultantes se designarán en el presente documento como agente de unión a la diana-carga activa, por ejemplo, el ML66 conjugado con 22a es ML66-22a

15 Ejemplo 47. Síntesis de ML66-22a

ML66-22a: Se trató ML66 en 5 mg/mL con 7,0 equivalentes de TCEP en EPPS 50 mM a pH 7,4, EDTA 5 mM a 37°C durante 1-1,5 h. La mezcla después se enfrió a temperatura ambiente. La reacción de conjugación entre el anticuerpo y la carga activa se realizó a 2 mg/mL añadiendo 15-20 equivalentes de 22a disueltos en DMSO en tampón (EPPS 50 mM, pH 7,4) que contenía DMSO al 20%, y girando en un rotador de tubos durante 1,5-2,5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó inmediatamente en tampón de formulación (acetato 10 mM, sacarosa al 9%, Tween-20 al 0,01%, pH 5,0) usando columnas de desalación NAP (Ilustra Sephadex G-25, GE Healthcare). El conjugado resultante tenía una relación de fármaco a anticuerpo (DAR) de 7,5, y era monomérico al 99 % medido por cromatografía de exclusión por tamaño.

25 Se llevaron a cabo evaluaciones biofísicas para el conjugado entre cadenas de DAR alta, incluyendo la determinación de la concentración del conjugado, rendimiento, DAR (relación de fármaco a anticuerpo), fármaco libre, porcentaje de monómero y distribución de DAR. Se determinó que la concentración de conjugado tenía una concentración de proteína final de 4,5 mg/mL (por UV-Vis usando el coeficiente de extinción $\epsilon_{280} = 205520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), DAR 7,5 (por UV-Vis usando los coeficientes de extinción $\epsilon_{280} = 10764 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{370} = 20982 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para 22a), 99% de monómero (por columna SEC de proteína BEH de UPLC de exclusión por tamaño), <1% de fármaco libre (por columna HPLC HiSep), y en su mayor parte de forma homogénea 8 fármacos unidos por anticuerpo (por espectrometría de masas Q-ToF, y cromatografía HIC de Butil-NPR). El rendimiento para esta conjugación entre cadenas específica de ML66-22a fue de 75%.

35 Método SEC de Proteína BEH UPLC: El análisis del porcentaje de monómero se llevó a cabo en un sistema clase H de Waters Acquity UPLC equipado con una columna de SEC de proteína BEH UPLC de Acquity (200 Å, 1,7 μm , 4,6 mm x 150 mm, componente n.º 186005225). La fase móvil era percloruro de sodio 400 mM, fosfato de sodio 50 mM, IPA al 5%, pH 7,0, caudal 0,30 mL/min, tiempo de análisis 20 min.

40 Método de HPLC HiSep: El análisis del porcentaje de fármaco libre se realizó en un sistema de HPLC Agilent equipado con una columna HiSep analítica Supelco (25 cm x 4,6 mm, 5 μm , n.º de Cat. 58919). La fase móvil consistía en amoníaco 0,1 M, pH 7,0 (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El método se realizó a 0,70 mL/min con disolvente A, usando un gradiente lineal empezando de 25% de disolvente B a 40% de disolvente B de 0 - 25 min.

Ejemplo 48. Ensayo de citotoxicidad in vitro

50 Se evaluaron potencias citotóxicas en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) usando un ensayo de viabilidad celular basado en la sal de tetrazonio soluble en agua (WST-8) (Dojindo, Molecular Technologies, Inc.) como se ha descrito previamente (Kovtun YV, et al. Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. *Cancer Res* 2010;70(6):2528-37). En resumen, se incubaron células tumorales humanas

(1.000-5.000 células/pocillo, dependiendo de la línea celular), en el medio de cultivo apropiado, con conjugados en presencia o ausencia de un exceso de los anticuerpos no conjugados correspondientes, o con los metabolitos durante 5 días, a 37 °C, CO₂ al 6%. La viabilidad celular se determinó a partir de la absorbancia de WST-8 corregida por el valor de fondo.

5

Los resultados de este estudio se resumen en las siguientes tablas. La FIG. 12 representa la citotoxicidad del compuesto que lleva sulfuro 8c y su sulfóxido 34a y sulfona 34b.

Tabla 7A. Citotoxicidades in vitro (valores de IC₅₀) de compuestos no conjugados

10

Compuesto	Líneas celulares (concentraciones molares de compuestos)					
	Namalwa	KB	N-Luc	SUDHL-1	HSC-2	MDA-MB-468
998	3.E-10		4.E-10	2.E-10	1.E-09	9.E-10
4a	3.E-09				4.E-09	
4b	1.E-09				3.E-09	
7a	9.E-10		1.E-09	5.E-10	4.E-09	3.E-09
7b			2.E-09		7.E-09	
7c			7.E-10	2.E-10	1.E-09	1.E-09
8a	2.E-10	6.E-10	9.E-10		6.E-10	2.E-09
33a	7.E-10				2.E-09	
34a		7.E-09			9.E-09	7.E-09
34b		2.E-09			3.E-09	3.E-09
35a				6.E-10	7.E-09	

Tabla 7B. Citotoxicidades in vitro (valores de IC₅₀) de compuestos no conjugados

Compuesto	Líneas celulares (concentraciones molares de compuestos)	
	N-Luc	HSC-2
998	6E-10	1E-09
7a	9E-10	2E-9
8a	2E-10	5E-10
8c	2E-10	4E-10
8p	2E-10	6E-10
N-Luc indica células de Namalwa que se transfectaron establemente con el gen de Luciferasa		

15 Ejemplo 49. Ensayo de destrucción celular de vecindad (*bystander*)

Los reactivos Cell Titer Glo y One Glo se adquirieron de Promega. La capacidad de los ADC para inducir la muerte por vecindad se determinó mediante uno de dos ensayos. Ambos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Costar) para mantener las células antígeno negativas (Ag-) y antígeno positivas (Ag+) mezcladas en estrecha proximidad entre sí.

20

Se incubaron células Ag- Namalwa-Luciferasa (N-Luc) (1000 células por pocillo) en el medio de cultivo apropiado en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U con el número designado de células Ag+ MDA-MB-468 y ADC (1,1 nM) durante 5 días, a 37 °C, CO₂ al 6%. La concentración de conjugado usada en el ensayo era lo suficientemente alta como para destruir todas las células Ag+ pero no era capaz de destruir las células Ag- a menos que también estuvieran presentes células Ag+. El día 5, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo Cell Titer Glo según el protocolo del fabricante; las señales de luminiscencia se leyeron usando un lector de placas Victor3. La siguiente tabla muestra las citotoxicidades in vitro obtenidas en el Ejemplo anterior y la destrucción por vecindad de los compuestos descritos en el presente documento.

25

30

Tabla 8. Citotoxicidades in vitro y destrucción por vecindad de ADC

ADC	DAR	Líneas celulares (concentraciones de ADC)			Por vecindad
		HSC-2	N-Luc	MDA-MB-468	
ML66-999	7,5	7,0E-11	1E-7	7E-10	2E-9
ML66-22a	7,5	7,0E-11	1E-7	4E-10	4E-9
ML66-22c	7,8		1,0E-7	2,0E-9	6,0E-8
ML66-22d	7,1		2,0E-7	4,0E-8	9,0E-9
ML66-22e	6,9		3,0E-7	4,0E-10	2,0E-9
ML66-25a	6,9	1,0E-8			
ML66-25b	7,3	>4E-7			
ML66-28a	6,6		5E-7	7E-10	5E-10

(continuación)

ADC	DAR	Líneas celulares (concentraciones de ADC)			Por vecindad
ML66-28c	5,9		7,0E-8		
ML66-28b	6,9		2,0E-8	7,0E-10	5,0E-10
ML66-28d	6,6		>2E-7	7,0E-10	4,0E-10
ML66-32a	6,5		3,0E-8	3E-9	2,0E-9
ML66-32b			6E-7	1E-9	6E-10
N-Luc indica células de Namalwa que se transfectaron establemente con el gen de Luciferasa					

Ejemplo 50. Método para determinar la eficacia in vivo en modelos de xenoinjerto

- 5 Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Todos los procedimientos in vivo se realizaron en estricto acuerdo con la Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La eficacia in vivo de los ADC se evaluó en los modelos de xenoinjerto tumoral dados. Se inoculó en los ratones SCID hembra por vía subcutánea en el flanco derecho el tipo de célula deseado en una relación 1:1 de medio exento de suero. Los animales se distribuyeron entonces aleatoriamente en grupos de 6 u 8
- 10 ratones por grupo. Los ratones de control se trataron con solución salina tamponada con fosfato, vehículo. Las concentraciones requeridas de los ADC se hicieron diluyendo muestras de solución madre con vehículo. Los xenoinjertos se hicieron crecer hasta aproximadamente 100 mm³, después se administró ADC o vehículo a los ratones por inyección intravenosa (i.v.) en la vena de la cola (200 µL/ratón). Toda la dosificación se basó en el peso del componente anticuerpo del conjugado. Se midieron los tamaños de los tumores dos veces por semana en tres dimensiones usando un calibre, con los volúmenes tumorales expresados en mm³ calculados usando la fórmula $V = 1/2(\text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura})$. El peso corporal también se midió dos veces por semana. Los
- 15 datos de estos estudios se interpretaron usando métodos estandarizados como se ha descrito previamente (Bissery MC et al. Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* 1991;51(18):4845-52).

20

Ejemplo 51. Tolerabilidad de los ratones a los ADC ML66-999, ML66-22a y ML-28a

- La tolerabilidad de los ADC se evaluó en ratones CD-1 hembra realizando mediciones diarias del peso corporal y observaciones clínicas durante 2 semanas después de la inyección de los ADC. Se administró por vía
- 25 intravenosa una predosis de 10 mg/kg de anticuerpo ML66 desnudo a treinta y dos ratones CD-1 hembra de 7 semanas de edad porque se mostró que esto aliviaba la reacción aguda a la infusión causada por ML66 solo en dosis mayores de 20 mg/kg. Un ratón murió después de esta inyección de anticuerpo desnudo. Dos horas más tarde, tres grupos de siete a ocho ratones recibieron cada uno una dosis con una inyección intravenosa en bolo de 1500 µg/kg de carga activa de ML66-999 (58 mg/kg de anticuerpo), ML66-22a (59 mg/kg de anticuerpo) o ML66-28a (69 mg/kg de anticuerpo). La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como la dosis
- 30 más alta con la que ningún animal murió o fue necesario sacrificar debido a >20% de pérdida de peso corporal o signos de sufrimiento o morbilidad (encorvarse, falta de movimiento, incapacidad para comer o beber, o signos de dolor/sufrimiento). Basándose en estos criterios, los tres ADC fueron bien tolerados con una dosis de carga activa de 1500 µg/kg. La FIG. 19 representa la tolerabilidad del ratón a los ADC ML66-999, ML66-22a y ML66-28a.
- 35

Ejemplo 52. Método para la determinación de los parámetros farmacocinéticos (PK) de ADC en ratones

- Tres grupos de once ratones CD-1 hembra de 7 semanas de edad recibieron cada uno una única inyección
- 40 intravenosa en bolo de 10 mg/kg de anticuerpo desnudo o ADC. Se recogieron muestras de sangre terminal de 3 ratones a los 2 minutos, 3 ratones a las 24 horas, y 5 ratones a las 72 horas después de las inyecciones para cada ADC. La sangre se procesó a suero y los ADC se purificaron usando captura por afinidad con perlas de anti-Fc humano. Las muestras se analizaron mediante ELISA para anti-Fc humano para determinar la concentración del componente de anticuerpo (independientemente de la carga de carga activa). Las muestras
- 45 también se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y espectrometría de masas (MS). La pérdida parcial de enlazador-carga activa del ADC capturado en todos los puntos de tiempo se midió por el método de MS intacta. La concentración de ADC se calculó basándose en la concentración total de anticuerpo y la relación de fármaco a anticuerpo (DAR).

- 50 La FIG. 13 y la Tabla 9 muestran la farmacocinética de ML66-999 en ratones. La FIG. 14 y la Tabla 10 muestran la farmacocinética de ML66-999 en ratones. La Tabla 11 resume la unión de los ADC o anticuerpo desnudo a las correspondientes líneas celulares que expresan antígeno. Las FIGs. 15 y 16 muestran las citotoxicidades in vitro de ML66-999 y ML66-22a contra células Ag+ y Ag-. La bioactividad retenida fraccionaria del ADC en las muestras de plasma a lo largo del tiempo se determinó en ensayos de citotoxicidad con células Ag+ o Ag-.
- 55 Los ADC retuvieron la mayor parte de su actividad contra las células Ag+ en cada uno de los puntos de tiempo, mientras que permanecieron más de 200 veces menos activos contra las células Ag-, lo que indica que las citotoxicidades se debieron a los ADC intactos con poca o ninguna contribución de cualquier carga activa

liberada.

Tabla 9.

ML66-999	Conc. de Ab total (µg/mL) por ELISA	Conc. de ADC (µg/mL) por Espec. de masas	DAR por Espec. de masas
ADC referencia	NA	NA	7,68
0,033 h (2 min)	240	238	7,62
24 h	85	84	7,62
72 h	57	50	6,72

5

Tabla 10.

ML-66-22a	Conc. de Ab total (µg/mL) por ELISA	Conc. de ADC (µg/mL) por Espec. de masas	DAR por Espec. de masas
ADC referencia	NA	NA	6,98
0,033 h (2 min)	169	168	6,92
24 h	80	74	6,50
72 h	54	43	5,60

Tabla 11. Unión de los ADC o anticuerpo desnudo a las correspondientes líneas celulares que expresan antígeno.

10

Designación	DAR	Línea celular (EC50 de unión, M)	
		NCI-H2110	PC-9
ML66 desnudo		2E-9	
ML66-999	7,4	3E-9	
ML66-22a	7,5	3E-9	
ML66-22c	7,8	7E-10	
ML66-22d	7,1	2E-9	
ML66-22e	6,9	2E-9	
ML66-25a	6,9	5E-9	
ML66-25b	7,2	3E-9	
ML66-28a	6,6	1E-9	
ML66-28b	6,9		1E-9
ML66-28c	5,9		2E-9
ML66-28d	6,6		1E-9
ML66-32a	7,5	1E-09	

Ejemplo 53. Actividad antitumoral de conjugados de anticuerpo anti-EGFR-fármaco en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano HSC-2

15

La actividad antitumoral de 1, 3 y 10 mg/kg de ML66-999 y ML66-22a se evaluó en ratones atímicos hembra que portaban células HSC-2, un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano.

20

Se inocularon a los ratones 1×10^7 células HSC-2 en 0,1 mL de 50% de Matrigel/50% de medio exento de suero por inyección subcutánea en la zona del flanco trasero derecho. Se obtuvieron ratones Foxn1^{nu} atímicos hembra (6 semanas de edad). Tras la recepción, se observaron los animales durante 9 días antes del inicio del estudio. Los animales no mostraron signos de enfermedad o dolencia al llegar o antes del tratamiento.

25

Se aleatorizaron cuarenta y ocho ratones en 8 grupos (6 ratones por grupo) según el volumen tumoral. Los volúmenes tumorales variaban de 68,48 a 118,26 ($93,42 \pm 11,25$, media $\pm$ DE) mm³. Los ratones se midieron, aleatorizaron y recibieron la dosis en función del volumen del tumor el día 4 después de la implantación (11/12/18). El peso corporal de los ratones variaba de 19,46 a 25,77 ($22,98 \pm 1,50$, media $\pm$ DE) gramos. Los ratones de cada grupo se identificaron por el método de perforación. La administración de los agentes de

30

ensayo y el vehículo se realizó por vía intravenosa usando una jeringa de 1,0 mL equipada con una aguja de calibre 27 de 12,7 mm (½ pulgada). Los agentes de ensayo de conjugado de anticuerpo-fármaco se administraron cada día x1 en 1, 3 o 10 mg/kg, donde 75 µg/kg o 250 µg/kg basado en la carga activa se correlaciona con aproximadamente 3 o 10 mg/kg basado en la concentración de anticuerpo. Los grupos incluyeron: un grupo de control al que se administró vehículo (PBS, 200 µL), un grupo de control al que se

35

administró el KTI-999 no dirigido en 10 mg/kg, ML66-999 administrado en 1, 3 y 10 mg/kg basado en la concentración de anticuerpo, y ML66-22a administrado en 1, 3 y 10 mg/kg basado en la concentración de anticuerpo.

Se midió el tamaño de los tumores dos veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. El volumen tumoral se expresó en mm³ utilizando la fórmula Volumen = longitud × ancho × altura × ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50% o más y una regresión tumoral completa (CR) era cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. El volumen tumoral se determinó con el software StudyLog.

La inhibición del crecimiento tumoral (% T/C) es la relación del volumen tumoral mediano (TV) del grupo de tratamiento (T) al TV mediano del grupo de control (C) en un tiempo predeterminado (p. ej., el tiempo en el que el TV mediano para los tumores de control alcanza un volumen tumoral máximo de ~1000 mm³, que es cuando se sacrifican los ratones). El % de T/C se calculó el día 22 después de la inoculación, cuando la mediana de TV del grupo de control alcanzó 1038 mm³. De acuerdo con los estándares de NCI, una T/C ≤ 42% es el nivel mínimo de actividad antitumoral y una T/C <10% se considera un nivel alto de actividad antitumoral.

El peso corporal (BW) de todos los ratones se midió dos veces por semana como un índice aproximado de la toxicidad del fármaco y se determinó mediante el software StudyLog. Los pesos corporales de los ratones se expresaron como cambio porcentual en el peso corporal respecto al peso corporal previo al tratamiento de la siguiente manera: % de cambio de BW = [(BW_{post} / BW_{pre}) - 1] × 100, donde BW_{post} es el peso después del tratamiento y BW_{pre} es el peso corporal inicial antes del tratamiento. El porcentaje de pérdida de peso corporal (BWL) se expresó como el cambio medio en el peso corporal después del tratamiento. Los animales se sacrificaron si el volumen tumoral llegaba a ser mayor de 1000 mm³, los tumores se volvían necróticos, los ratones perdían > 20% de su peso corporal inicial, o los ratones agonizaban en cualquier momento durante el estudio.

La FIG. 17 y la Tabla 12 muestran la eficacia de los ADC en modelos de xenoinjerto de HSC-2. Los conjugados ML66-999 y ML66-22a tenían actividad antitumoral similar. El ML66-KTI administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 70% (inactivo), sin regresiones tumorales. Esto demostró que la actividad de los conjugados de ML66 está dirigida a EGFR puesto que el ADC de control era inactivo. El ML66-999 administrado en 1 mg/kg tenía un valor de T/C de 49% (inactivo), sin regresiones tumorales. ML66-999 administrado en 3 mg/kg tenía un valor de T/C de 7% (altamente activo), con 4 regresiones tumorales parciales de 6 ratones y 1 regresión completa. ML66-999 administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 3% (altamente activo), con 6 regresiones tumorales parciales de 6 ratones y 2 regresiones completas. ML66-22a administrado en 1 mg/kg tenía un valor de T/C de 39% (activo), con 1 regresión tumoral parcial de 6 ratones y sin regresiones completas. ML66-22a administrado en 3 mg/kg tenía un valor de T/C de 5% (altamente activo), con 3 regresiones tumorales parciales de 6 ratones y 1 regresión completa. ML66-22a administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 2% (altamente activo), con 6 regresiones tumorales parciales de 6 ratones y 5 regresiones completas. No se observó una pérdida de peso corporal significativa con ninguna de las dosis indicadas para ninguno de los conjugados, lo que indica que los conjugados eran bien tolerados. Los resultados de este estudio sugieren que tanto los conjugados ML66-999 como ML66-22a demostraron actividad antitumoral dependiente de la dosis y eran eficaces en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello HSC-2.

Tabla 12.

ADC (DAR)	Dosis de ADC		HSC-2		
	carga activa µg/kg	Ab mg/kg	T/C (día 22)	PR	CR
KTI-999 (7,6)	259	10	70%	0/6	0/6
ML66-999 (7,5)	254	10	3%	6/6	2/6
ML66-999 (7,5)	76	3	7%	4/6	1/6
ML66-999 (7,5)		1	49%	0/6	0/6
ML66-22a (7,5)	258	10	2%	6/6	5/6
ML-66-22a (7,5)	77	3	5%	3/6	1/6
ML66-22a (7,5)		1	39%	1/6	0/6

Ejemplo 54. Actividad antitumoral de conjugados en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)

La actividad antitumoral de los conjugados en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) se determinó de una manera similar a la de las células HSC-2 como se describe en el Ejemplo 53.

Los ratones atímicos hembra (Foxn1^{nu}) de 6 semanas de edad se recibieron de Charles River Laboratories. Todos los procedimientos *in vivo* se realizaron en estricto acuerdo con la Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La actividad antitumoral de los ADC se evaluó en modelos de xenoinjerto de tumor escamoso H1703 de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). Se inoculó en ratones atímicos hembra por

vía subcutánea en el flanco derecho el tipo de célula deseado en una relación 1:1 de medio exento de suero: Matrigel (5 x 10⁶ células/ratón). Se midieron los volúmenes tumorales (TV) dos veces por semana en tres dimensiones usando un calibre, con los volúmenes tumorales expresados en mm³ calculados usando la fórmula TV = 1/2(longitud × ancho × altura). Los xenoinjertos se hicieron crecer hasta ~100 mm³ y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 6 ratones por grupo basándose en su TV el día 16 (con un TV de 116,0 +/- 18,5 mm³ [media +/- DE]) después de la inoculación celular. Los ADC de las soluciones madre se diluyeron con tampón de dilución de conjugado y los ratones se dosificaron por los pesos corporales individuales. Los ratones recibieron una única inyección intravenosa (IV) en bolo de vehículo (solución salina tamponada con fosfato (PBS) en 200 µL/ratón) o ADC en 75 µg/kg o 250 µg/kg basado en la carga activa (aproximadamente 3 o 10 mg/kg basado en la concentración de anticuerpo) en un volumen de dosis de 5 mL/kg. La inhibición del crecimiento tumoral (T/C) es la relación del volumen tumoral mediano (TV) del grupo de tratamiento (T) al TV mediano del grupo de control (C) en un tiempo predeterminado (p. ej., el tiempo en el que el TV mediano para los tumores de control alcanza un volumen tumoral máximo de ~1000 mm³, que es cuando se sacrifican los ratones). De acuerdo con los estándares de NCI, una T/C ≤ 42% es el nivel mínimo de actividad antitumoral y una T/C <10% se considera un nivel alto de actividad antitumoral. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el TV se reducía en 50% o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. T/C, PR y CR para ambos estudios de eficacia se indican en la siguiente tabla. Los pesos corporales también se midieron dos veces por semana como un índice aproximado de toxicidad del fármaco.

La FIG. 20 y la Tabla 14 representan la eficacia de los ADC en modelos de xenoinjertos H1703. Los resultados sugieren que tanto los conjugados ML66-999 como ML66-22a demostraron actividad antitumoral dependiente de la dosis y eran eficaces en el modelo de xenoinjerto de tumor H1703.

Tabla 14. Resultados del estudio de eficacia en H1703

ADC (DAR)	Dosis de ADC		H1703		
	carga activa µg/kg	Ab mg/kg	T/C (día 43)	PR	CR
KTI-999 (7,6)	250	9,9	58	0/6	0/6
ML66-999 (7,6)	250	9,7	13	3/6	1/6
ML66-999 (7,6)	75	2,9	86	0/6	0/6
ML66-22a (7,5)	250	9,8	9	3/6	0/6
ML66-22a (7,5)	75	2,9	69	0/6	0/6
ML66-22b (6,4)	250	11,4	3	6/6	0/6
ML66-22b (6,4)	75	3,4	7	4/6	2/6

Ejemplo 55. Actividad antitumoral de conjugados de anticuerpo anti-EGFR-fármaco en ratones atímicos portadores de xenoinjertos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano FaDu

La actividad antitumoral de 1, 3 y 10 mg/kg de ML66-999 y ML66-22a se evaluó en ratones atímicos hembra que portaban células FaDu, un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello humano.

Se inocularon a los ratones 1 x 10⁷ células FaDu en 0,1 mL de 50% de Matrigel/50% de medio exento de suero por inyección subcutánea en la zona del flanco trasero derecho. Se obtuvieron ratones Foxn1^{nu} atímicos hembra (6 semanas de edad). Tras la recepción, los animales se observaron durante 7 días antes del inicio del estudio. Los animales no mostraron signos de enfermedad o dolencia al llegar o antes del tratamiento.

Sesenta y cuatro ratones se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos (8 ratones por grupo) por volumen tumoral. Los volúmenes tumorales oscilaban de 74,07 a 128,73 (104,66 ± 15,70, Media ± DE) mm³. Los ratones se midieron, aleatorizaron y recibieron la dosis en función del volumen del tumor el día 6 después de la implantación (11/19/18). El peso corporal de los ratones variaba de 20,48 a 25,77 (23,55 ± 1,25, media ± DE) gramos. Los ratones de cada grupo se identificaron por el método de perforación. La administración de los agentes de ensayo y el vehículo se realizó por vía intravenosa usando una jeringa de 1,0 mL equipada con una aguja de calibre 27 de 12,7 mm (½ pulgada). Los agentes de ensayo de conjugado de anticuerpo-fármaco se administraron cada día x1 en 1, 3 o 10 mg/kg. Los grupos incluían: un grupo de control al que se le administró vehículo (PBS, 200 µL), un grupo de control al que se le administró KTI-999 no dirigido en 10 mg/kg, ML66-999 al que se le administró 1, 3 y 10 mg/kg, y ML66-22a al que se le administró 1, 3 y 10 mg/kg.

Se midió el tamaño de los tumores dos veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. El volumen tumoral se expresó en mm³ utilizando la fórmula Volumen = longitud × ancho × altura × ½. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50% o más y una regresión tumoral completa (CR) era cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. El volumen tumoral se determinó con el software StudyLog.

La inhibición del crecimiento tumoral (% T/C) es la relación del volumen tumoral mediano (TV) del grupo de tratamiento (T) al TV mediano del grupo de control (C) en un tiempo predeterminado (p. ej., el tiempo en el que el TV mediano para los tumores de control alcanza un volumen tumoral máximo de ~1000 mm³, que es cuando se sacrifican los ratones). El % de T/C se calculó el día 21 después de la inoculación, cuando la mediana del TV del grupo de control alcanzó 749 mm³. De acuerdo con los estándares de NCI, una T/C ≤ 42% es el nivel mínimo de actividad antitumoral y una T/C <10% se considera un nivel alto de actividad antitumoral.

El peso corporal (BW) de todos los ratones se midió dos veces por semana como un índice aproximado de la toxicidad del fármaco y se determinó mediante el software StudyLog. Los pesos corporales de los ratones se expresaron como cambio porcentual en el peso corporal respecto al peso corporal previo al tratamiento de la siguiente manera: % de cambio de BW = [(BWpost / BWpre) - 1] × 100, donde BWpost es el peso después del tratamiento y BWpre es el peso corporal inicial antes del tratamiento. El porcentaje de pérdida de peso corporal (BWL) se expresó como el cambio medio en el peso corporal después del tratamiento. Los animales se sacrificaron si el volumen tumoral llegaba a ser mayor de 1000 mm³, los tumores se volvían necróticos, los ratones perdían > 20% de su peso corporal inicial, o los ratones agonizaban en cualquier momento durante el estudio.

La FIG. 18 y la Tabla 13 representan la eficacia de los ADC en modelos de xenoinjerto de FaDu. Los conjugados ML66-999 y ML66-22a tenían actividad antitumoral similar. ML66-KTI administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 20% (activo), con 2 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 2 regresiones completas. Esto demostró que parte de la actividad antitumoral en este modelo no está dirigida. ML66-999 administrado en 1 mg/kg tenía un valor de T/C de 12% (activo), con 4 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 2 regresiones completas. ML66-999 administrado en 3 mg/kg tenía un valor de T/C de 2% (altamente activo), con 8 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 4 regresiones completas. ML66-999 administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 0% (altamente activo), con 8 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 8 regresiones completas. ML66-22a administrado en 1 mg/kg tenía un valor de T/C de 13% (activo), con 4 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 3 regresiones completas. ML66-22a administrado en 3 mg/kg tenía un valor de T/C de 0% (altamente activo), con 8 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 8 regresiones completas. ML66-22a administrado en 10 mg/kg tenía un valor de T/C de 0% (altamente activo), con 8 regresiones tumorales parciales de 8 ratones y 8 regresiones completas. No se observó una pérdida de peso corporal significativa con ninguna de las dosis indicadas para ninguno de los conjugados, lo que indica que los conjugados eran bien tolerados. Los resultados de este estudio sugieren que tanto los conjugados ML66-999 como ML66-22a demostraron actividad antitumoral dependiente de la dosis y eran eficaces en el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello FaDu.

Tabla 13.

ADC, dosis (mg/kg)	T/C Día 21	PR	CR
KTI-999 (10)	20%	2/8	2/8
ML66-999 (10)	0%	8/8	8/8
ML66-999 (3)	2%	8/8	4/8
ML66-999 (1)	12%	4/8	2/8
ML66-22a (10)	0%	8/8	8/8
ML66-22a (3)	0%	8/8	8/8
ML66-22a (1)	13%	4/8	3/8

Ejemplo 56. Tolerabilidad en ratón de los ADC Ab_F-999 y Ab_F-22a:

La tolerabilidad de los ADC sin reactividad cruzada se evaluó en ratones CD-1 hembra realizando mediciones diarias del peso corporal y observaciones clínicas durante 2 semanas después de la inyección de los ADC. Tres grupos de tres ratones recibieron cada uno una inyección IV en bolo de 5000 µg/kg basado en la carga activa del Ab_F-22a (184 mg/kg basado en el anticuerpo) o Ab_F-999 (198 mg/kg de anticuerpo). La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como la dosis más alta con la que ningún animal murió o fue necesario sacrificar debido a >20% de pérdida de peso corporal o signos de sufrimiento o morbilidad (encorvarse, falta de movimiento, incapacidad para comer o beber, o signos de dolor/sufrimiento). Se usó GraphPad para los análisis estadísticos de los pesos corporales en cada grupo (ANOVA de doble vía con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey mostró que el grupo de Ab_F-999 era significativamente diferente tanto del grupo vehículo como de Ab_F-22a, p<0,05). La FIG. 21 representa estos resultados.

Aunque se han ilustrado y descrito ciertas realizaciones, debe entenderse que pueden realizarse cambios y modificaciones en las mismas de acuerdo con la experiencia ordinaria en la técnica sin apartarse de la tecnología en sus aspectos más amplios como se define en las siguientes reivindicaciones.

Las realizaciones, descritas de manera ilustrativa en el presente documento, pueden practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos

específicamente en el presente documento.

- La presente descripción no está limitada en términos de las realizaciones particulares descritas en esta solicitud. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas. Se debe entender que esta descripción no está limitada a métodos, reactivos, compuestos o composiciones particulares, que pueden, por supuesto, variar. Debe comprenderse también que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante.
- Además, cuando se describen características o aspectos de la descripción en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.
- Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Se puede reconocer fácilmente que cualquier intervalo mencionado describe suficientemente y permite dividir el mismo intervalo en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos iguales, etc. Como ejemplo no limitante, cada intervalo analizado en el presente documento se puede dividir fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica, todos los lenguajes tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y similares, incluyen el número citado y se refieren a intervalos que pueden ser posteriormente divididos en subintervalos como se comentó anteriormente. Finalmente, como comprenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual.

REIVINDICACIONES

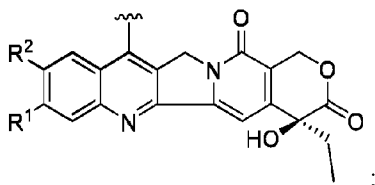
1. Un compuesto de Fórmula I, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

5 Z-L¹-D (Fórmula I)

en donde:

D se representa por la siguiente fórmula estructural:

10



R¹ es -F;

15 R² es -metilo;

-L¹-Z es (i) -(alquilen C₁-C₄)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₄)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₄)-N(R⁶)₂; o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-OR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SR⁶, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SSR⁶;

20

R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo; y

R⁶ es independientemente -H, metilo o bencilo;

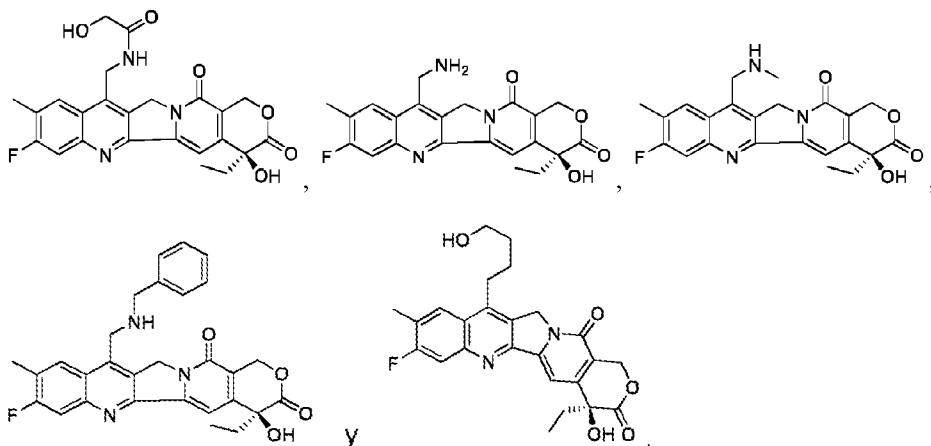
25 con la condición de que -L¹-Z no puede ser -CH₂OH.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde -L¹-Z es (i) -(CH₂)₂OH, -(CH₂)₃OH, -(CH₂)₄OH, -CH₂OMe, -(CH₂)₂OMe, -(CH₂)₃OMe, -(CH₂)₄OMe, -CH₂SH, -(CH₂)₂SH, -(CH₂)₃SH, -(CH₂)₄SH, -CH₂SMe, -(CH₂)₂SMe, -(CH₂)₃SMe, -(CH₂)₄SMe, -CH₂NH₂, -(CH₂)₂NH₂, -(CH₂)₃NH₂ o -(CH₂)₄NH₂, o (ii) -CH₂NHC(=O)CH₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OH, -CH₂NHC(=O)CH₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄OMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅OMe, -CH₂NHC(=O)CH₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SH, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SH, -CH₂NHC(=O)CH₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄SMe, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅SMe, -CH₂SCH₂SH, -CH₂S(CH₂)₂SH, -CH₂S(CH₂)₃SH, -CH₂S(CH₂)₄SH, -CH₂S(CH₂)₅SH, -CH₂SCH₂SMe, -CH₂S(CH₂)₂SMe, -CH₂S(CH₂)₃SMe, -CH₂S(CH₂)₄SMe o -CH₂S(CH₂)₅SMe.

35

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es uno cualquiera de los compuestos seleccionados de los siguientes:

40

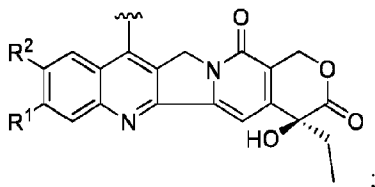


45 4. Un compuesto de fórmula II, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

E-A-Z'-L¹-D (Fórmula II)

en donde:

- 5 D se representa por la siguiente fórmula estructural:

R¹ es F;

10

R² es metilo;

L¹-Z'-* es (i) -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸*, o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸*, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸*, donde * es el sitio unido covalentemente a A;

15

cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo;

20

cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo;

A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

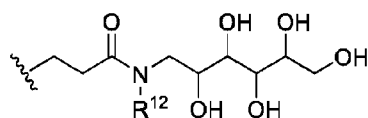
25

(i) -(alquilen C₁-C₆)-X⁵-Y³, en donde:X⁵ es -NR¹²C(=O)- o -C(=O)NR¹²-;Y³ es -alquilo C₁-C₁₀, donde Y³ está sustituido con 0-10 grupos OH; y

30

R¹² es -H, alquilo C₁-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, heteroarilo o bencilo; o

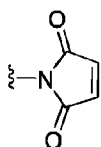
(ii)



35

; en donde R¹² es H o metilo;E es -C(=O)-(alquilen C₁-C₁₀)-X³; y

40

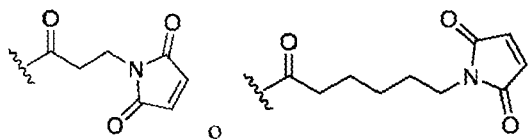
X³ es

45

5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde -L¹-Z'-* es (i) -CH₂O-CH₂NH-*, -(CH₂)₂O-CH₂NH-*, -(CH₂)₃O-CH₂NH-*, -(CH₂)₄O-CH₂NH-*, -CH₂S-CH₂NH-*, -(CH₂)₂S-CH₂NH-*, -(CH₂)₃S-CH₂NH-*, -(CH₂)₄S-CH₂NH-*, -CH₂NH-*, -(CH₂)₂NH-*, -(CH₂)₃NH-*, o -(CH₂)₄NH-; o (ii) -CH₂NHC(=O)CH₂O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅O-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)CH₂S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₂S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₃S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₄S-CH₂-NH-*, -CH₂NHC(=O)(CH₂)₅S-CH₂-NH-*, -CH₂S-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₂-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₃-CH₂-NH-*, -CH₂S(CH₂)₄-CH₂-NH-*, o -CH₂S(CH₂)₅-CH₂-NH-*.

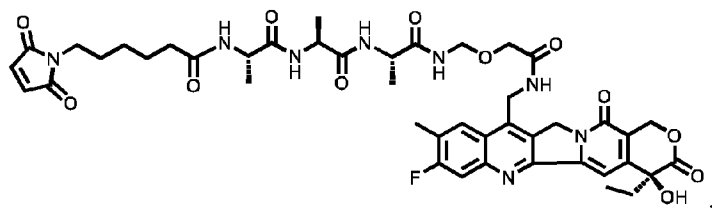
50

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en donde E es



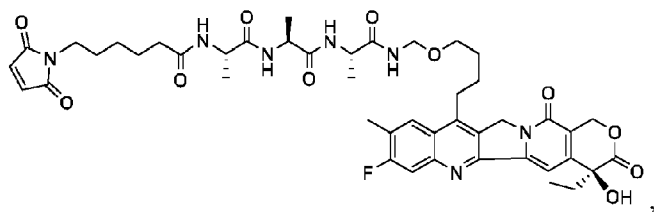
5

7. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula:



10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

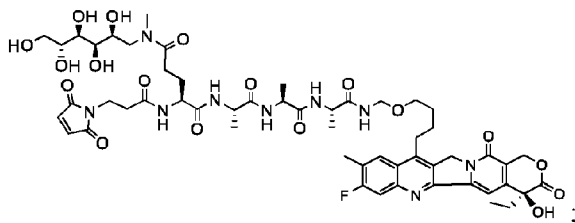
8. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula:



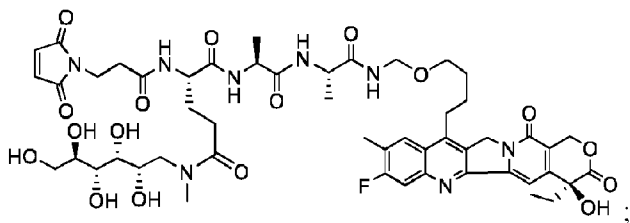
15

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. El compuesto de la reivindicación 4, en donde el compuesto se representa por la siguiente fórmula:

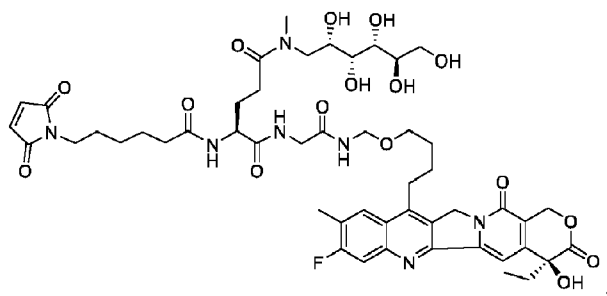


20



25

o



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

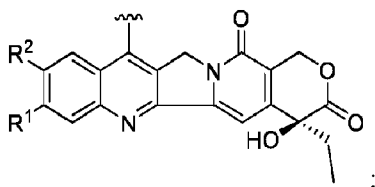
- 5 10. Un compuesto de Fórmula III, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:

CBA-E'-A-Z'-L¹-D (Fórmula III)

en donde:

10

D se representa por la siguiente fórmula estructural:



- 15 R¹ es F;

R² es metilo;

- 20 -L¹-Z'-* es (i) -(alquilen C₁-C₄)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₄)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₄)-NR⁸-, o (ii) -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-O-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-NR⁵C(=O)-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-S-CH₂-NR⁸-, o -(alquilen C₁-C₅)-S-(alquilen C₁-C₅)-SS-CH₂-NR⁸-, donde * es el sitio unido covalentemente a A;

cada R⁵ es independientemente -H, metilo o bencilo;

25

cada R⁸ es independientemente -H, metilo o bencilo;

A es un péptido que comprende de 2 a 10 aminoácidos; en donde A está opcionalmente sustituido con uno o más grupos que son:

30

(i) -(alquilen C₁-C₆)-X⁵-Y³, en donde:

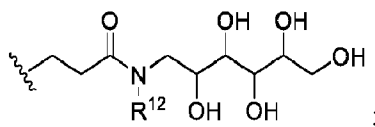
X⁵ es -NR¹²C(=O)- o -C(=O)NR¹²;

- 35 Y³ es -alquilo C₁-C₁₀, donde Y³ está sustituido con 0-10 grupos OH; y

R¹² es -H, alquilo C₁-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, arilo, heteroarilo o bencilo; o

(ii)

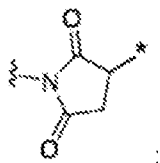
40



en donde R¹² es H o metilo;

- 45 E' es -C(=O)-(alquilen C₁-C₁₀)-X⁶-, donde * es el sitio unido covalentemente a CBA;

X⁶ es



y

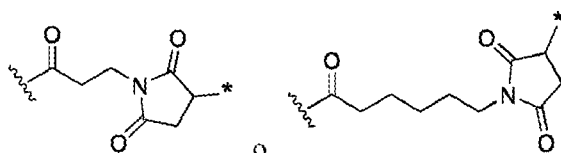
5

CBA es un agente de unión a células, en donde el agente de unión a células es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde $-L^1-Z^1-$ es (i) $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_2\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_4\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_3\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_4\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-$, o $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}-$ o (ii) $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{O}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$ o $-\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_5\text{S}-\text{CH}_2\text{NH}-$.

15

12. El compuesto de la reivindicación 10 o reivindicación 11, en donde E' es



20

13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 y 10-12, en donde A es $-(\text{AA}^1)-(\text{AA}^2)_{a1}-$, donde * es el punto de unión a E o E' , y en donde $-\text{AA}^1-(\text{AA}^2)_{a1}-$ es:

- (i) $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Ala}-\text{Val}-$, $-\text{Val}-\text{Ala}-$, $-\text{Val}-\text{Cit}-$, $-\text{Val}-\text{Lys}-$, $-\text{Lys}-\text{Val}-$, $-\text{Phe}-\text{Lys}-$, $-\text{Lys}-\text{Phe}-$, $-\text{Lys}-\text{Lys}-$, $-\text{Ala}-\text{Lys}-$, $-\text{Lys}-\text{Ala}-$, $-\text{Phe}-\text{Cit}-$, $-\text{Cit}-\text{Phe}-$, $-\text{Leu}-\text{Cit}-$, $-\text{Cit}-\text{Leu}-$, $-\text{Ile}-\text{Cit}-$, $-\text{Phe}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{Phe}-$, $-\text{Phe}-\text{N9-tosil-Arg}-$, $-\text{N9-tosil-Arg}-\text{Phe}-$, $-\text{Phe}-\text{N9-nitro-Arg}-$, $-\text{N9-nitro-Arg}-\text{Phe}-$, $-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Lys}-$, $-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{Phe}-$, $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Lys}-$, $-\text{Lys}-\text{Phe}-\text{Gly}-$, $-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Leu}-$, $-\text{Ile}-\text{Ala}-\text{Leu}-$, $-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Ile}-$, $-\text{Val}-\text{Ala}-\text{Val}-$, $-\text{Ala}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Leu}-$, $-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Leu}-\text{Ala}-$, $-\beta-\text{Ala}-\text{Leu}-\text{Ala}-\text{Leu}-$, $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Leu}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Phe}-\text{Gly}-$, $-\text{Val}-\text{Arg}-$, $-\text{Arg}-\text{Val}-$, $-\text{Arg}-\text{Arg}-$, $-\text{Ala}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{Met}-$, $-\text{Met}-\text{Ala}-$, $-\text{Thr}-\text{Thr}-$, $-\text{Thr}-\text{Met}-$, $-\text{Met}-\text{Thr}-$, $-\text{Leu}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{Leu}-$, $-\text{Cit}-\text{Val}-$, $-\text{Gln}-\text{Val}-$, $-\text{Val}-\text{Gln}-$, $-\text{Ser}-\text{Val}-$, $-\text{Val}-\text{Ser}-$, $-\text{Ser}-\text{Ala}-$, $-\text{Ser}-\text{Gly}-$, $-\text{Ala}-\text{Ser}-$, $-\text{Gly}-\text{Ser}-$, $-\text{Leu}-\text{Gln}-$, $-\text{Gln}-\text{Leu}-$, $-\text{Phe}-\text{Arg}-$, $-\text{Arg}-\text{Phe}-$, $-\text{Tyr}-\text{Arg}-$, $-\text{Arg}-\text{Tyr}-$, $-\text{Phe}-\text{Gln}-$, $-\text{Gln}-\text{Phe}-$, $-\text{Val}-\text{Thr}-$, $-\text{Thr}-\text{Val}-$, $-\text{Met}-\text{Tyr}-$ o $-\text{Tyr}-\text{Met}-$;
- (ii) $-\text{Val}-\text{D}-\text{Lys}-$, $-\text{Val}-\text{D}-\text{Arg}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{Cit}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{Lys}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{Arg}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{D}-\text{Cit}-$, $-\text{L}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Lys}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{D}-\text{Lys}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{D}-\text{Arg}-$, $-\text{L}-\text{Arg}-\text{D}-\text{Arg}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{Val}-\text{D}-\text{Cit}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Val}-$, $-\text{L}-\text{Gln}-\text{L}-\text{Val}-$, $-\text{L}-\text{Gln}-\text{L}-\text{Leu}-$ o $-\text{L}-\text{Ser}-\text{L}-\text{Val}-$;
- (iii) $-\text{Ala}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{Val}-$, $-\text{Val}-\text{Ala}-$, $-\text{Gln}-\text{Leu}-$, $-\text{Leu}-\text{Gln}-$, $-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-$, $-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Ala}-$, $-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}-$ o $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-$;
- (iv) $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Val}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Val}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Val}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Gln}-\text{L}-\text{Leu}-$, $-\text{L}-\text{Gln}-\text{D}-\text{Leu}-$, $-\text{L}-\text{Leu}-\text{L}-\text{Gln}-$, $-\text{L}-\text{Leu}-\text{D}-\text{Gln}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-$, $-\text{Gly}-\text{L}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{L}-\text{Ala}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{D}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{D}-\text{Ala}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{L}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{L}-\text{Val}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{D}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{L}-\text{Val}-\text{Gly}-$, $-\text{Gly}-\text{L}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}-$ o $-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{L}-\text{Phe}-\text{Gly}-$;
- (v) $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{D}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$, $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$ o $-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-\text{L}-\text{Ala}-$.

40

14. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

15. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica, opcionalmente, en donde:

55

(i) el cáncer es un linfoma o una leucemia;

5 (ii) el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), síndrome mielodisplásico (MDS), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfoblástica B aguda o leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), leucemia promielocítica aguda (APL), enfermedad linfoproliferativa crónica de células B (B-CLPD), leucemia linfocítica crónica atípica, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), leucemia de células del manto (MCL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica y linfoma de Burkitt;

10

(iii) el cáncer es cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer mieloide, melanoma y cáncer linfoide; o

15

(iv) el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

FIG. 1

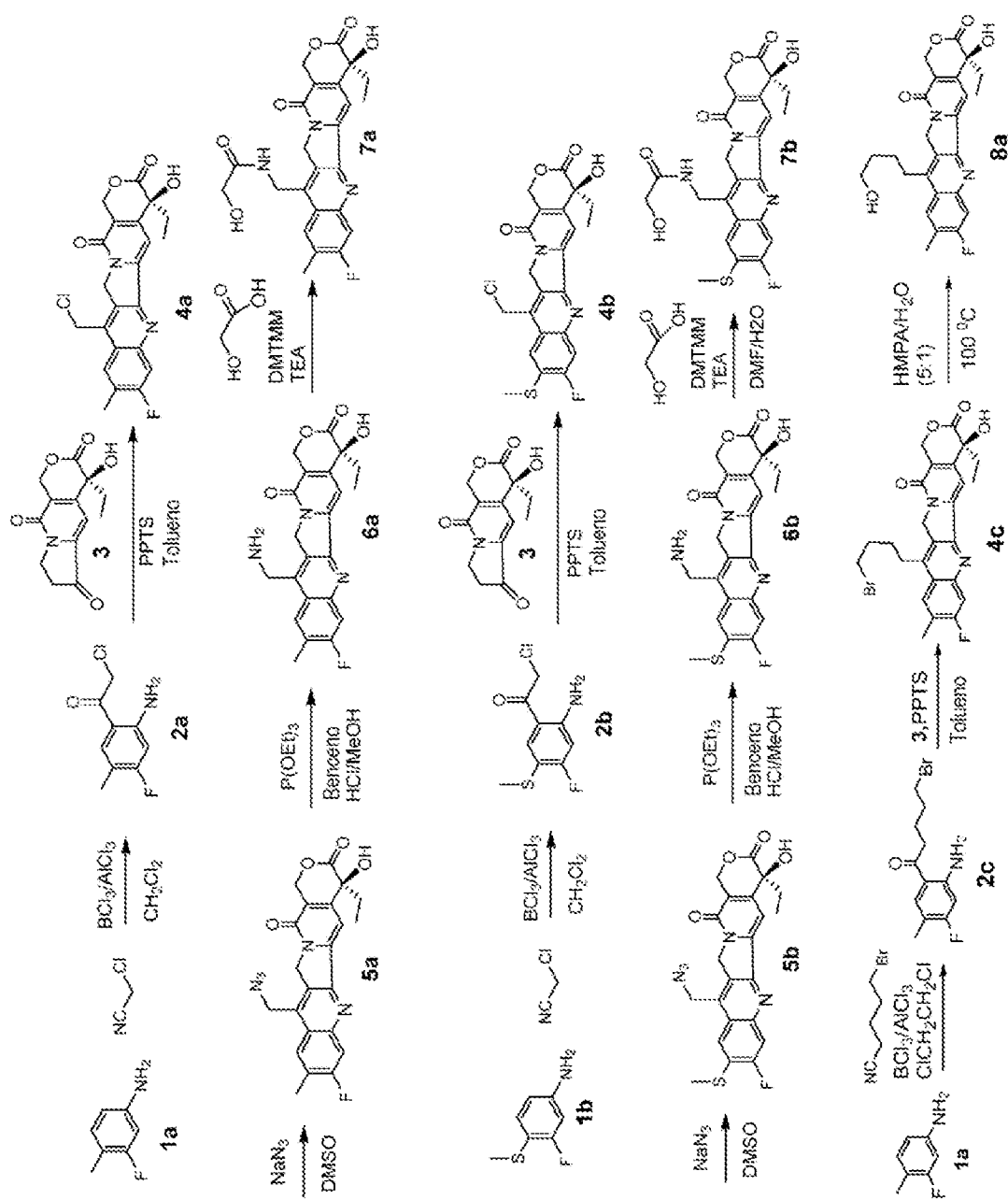
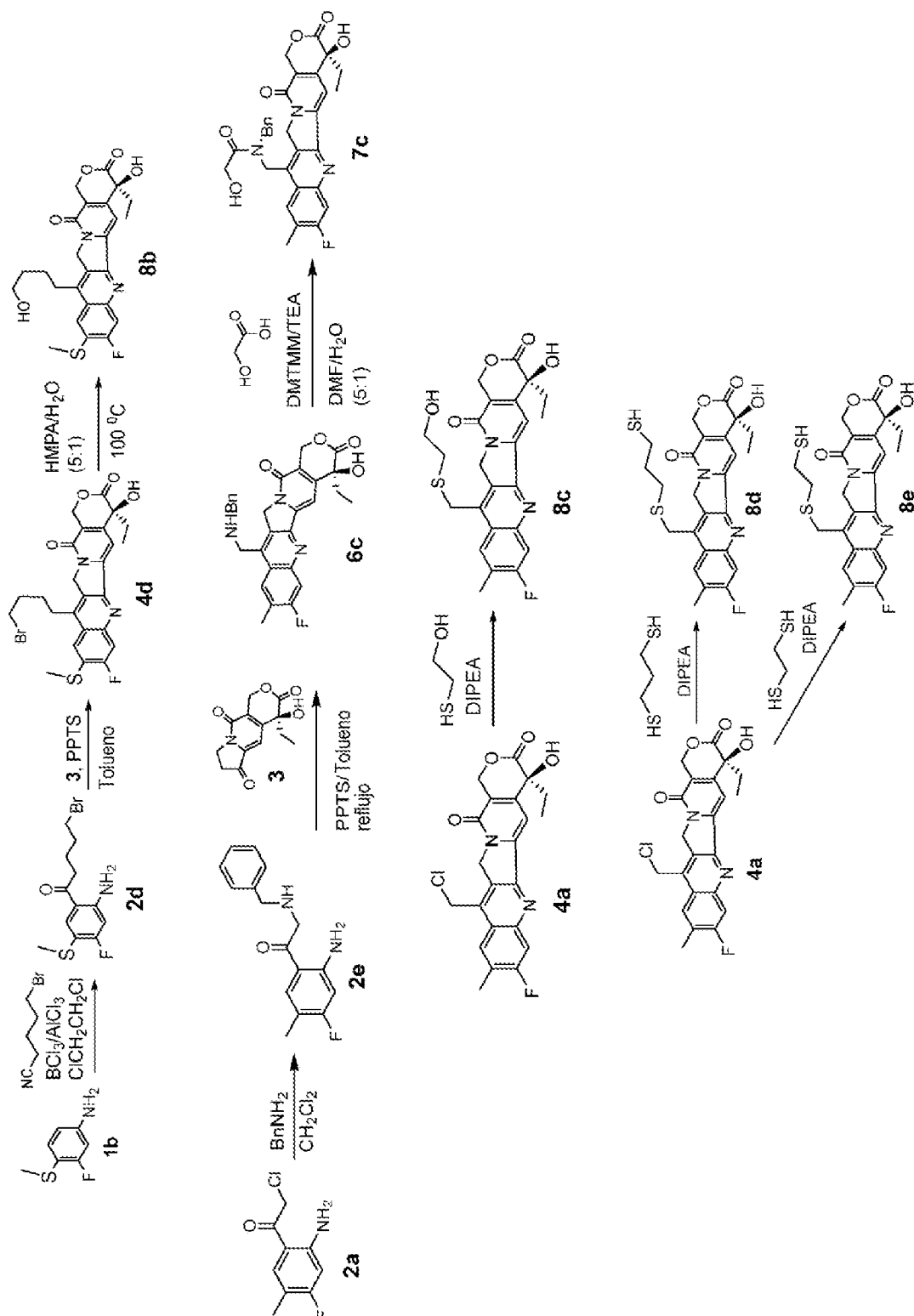


FIG. 2



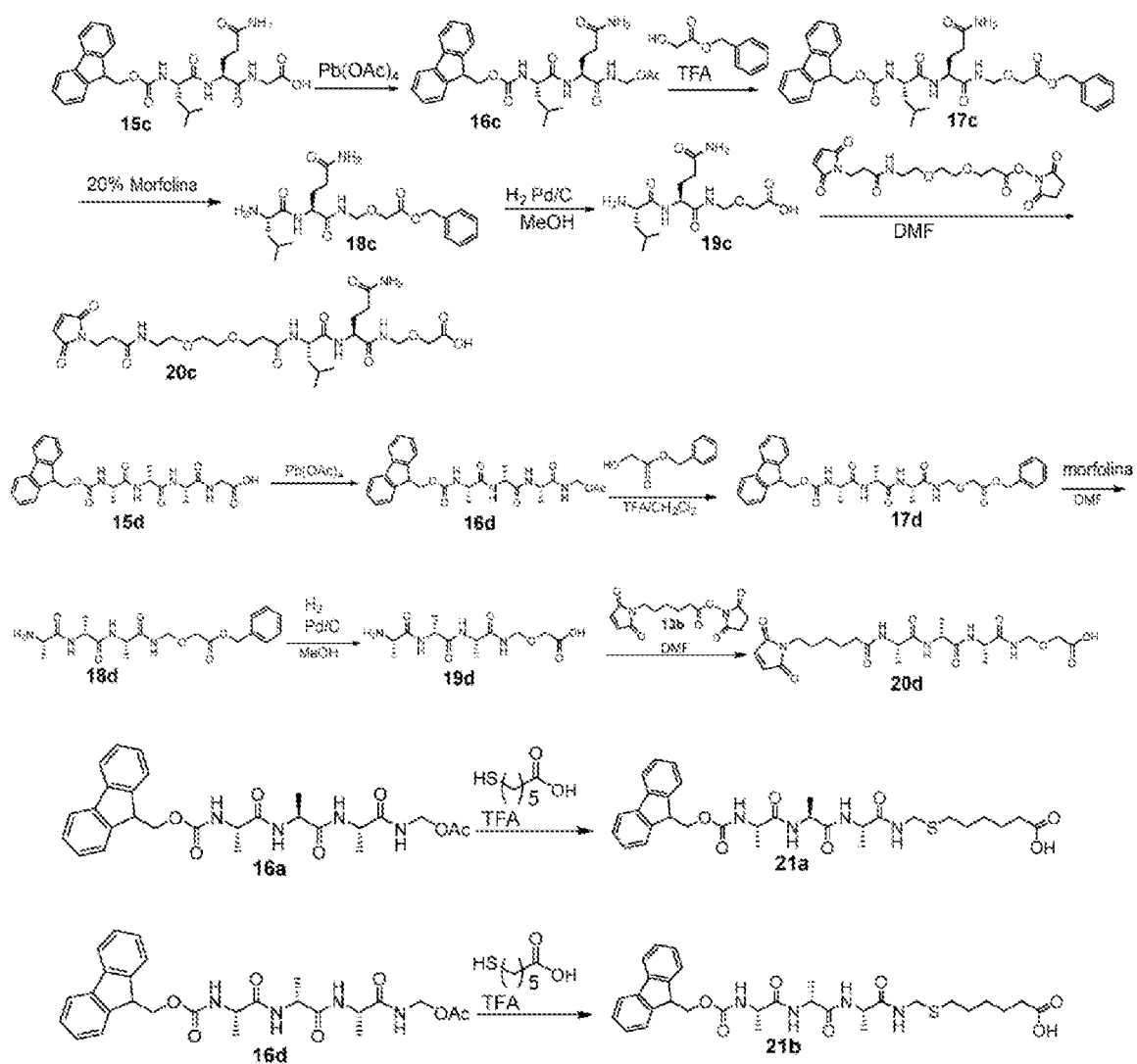


FIG. 5

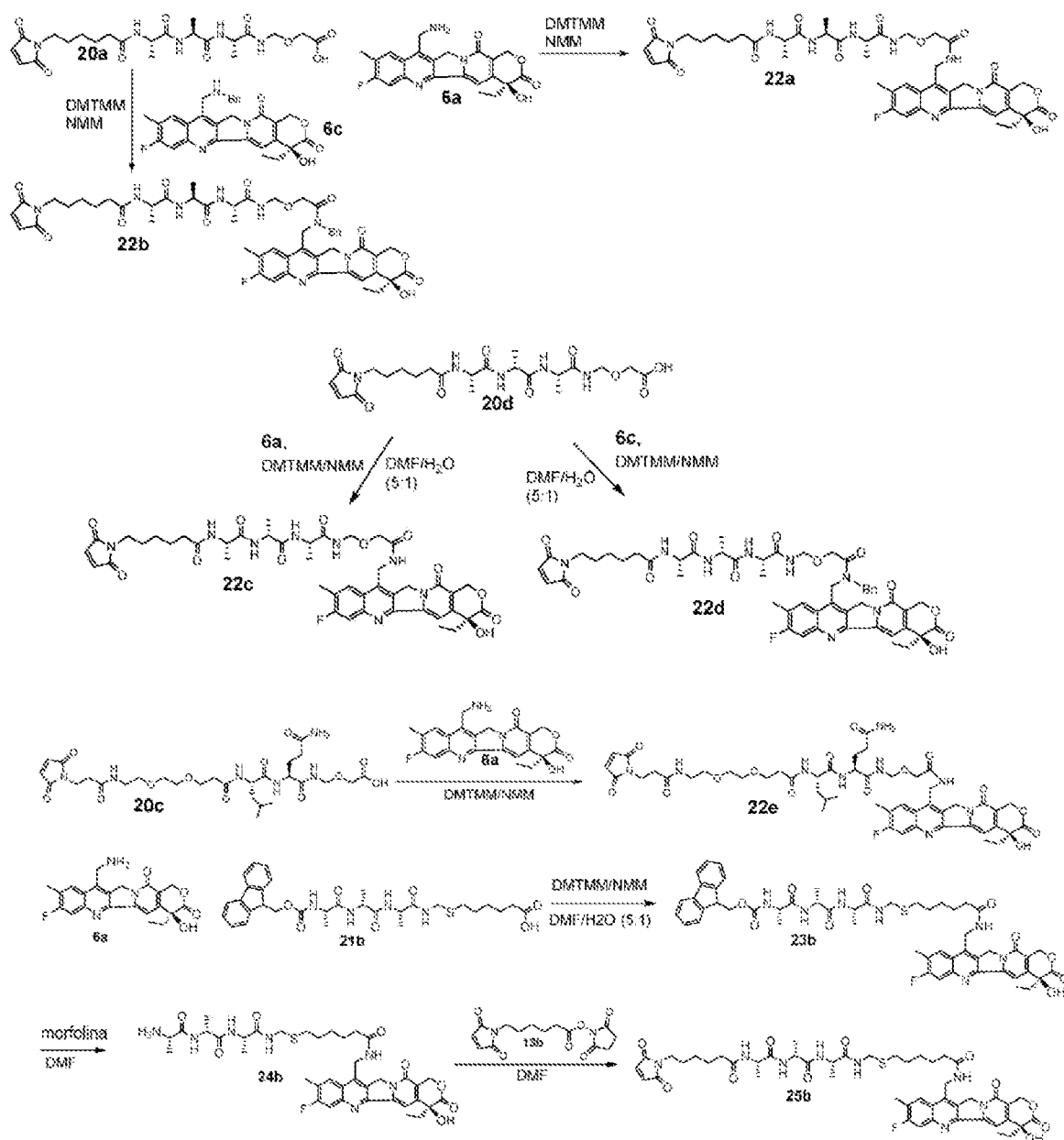


FIG. 7

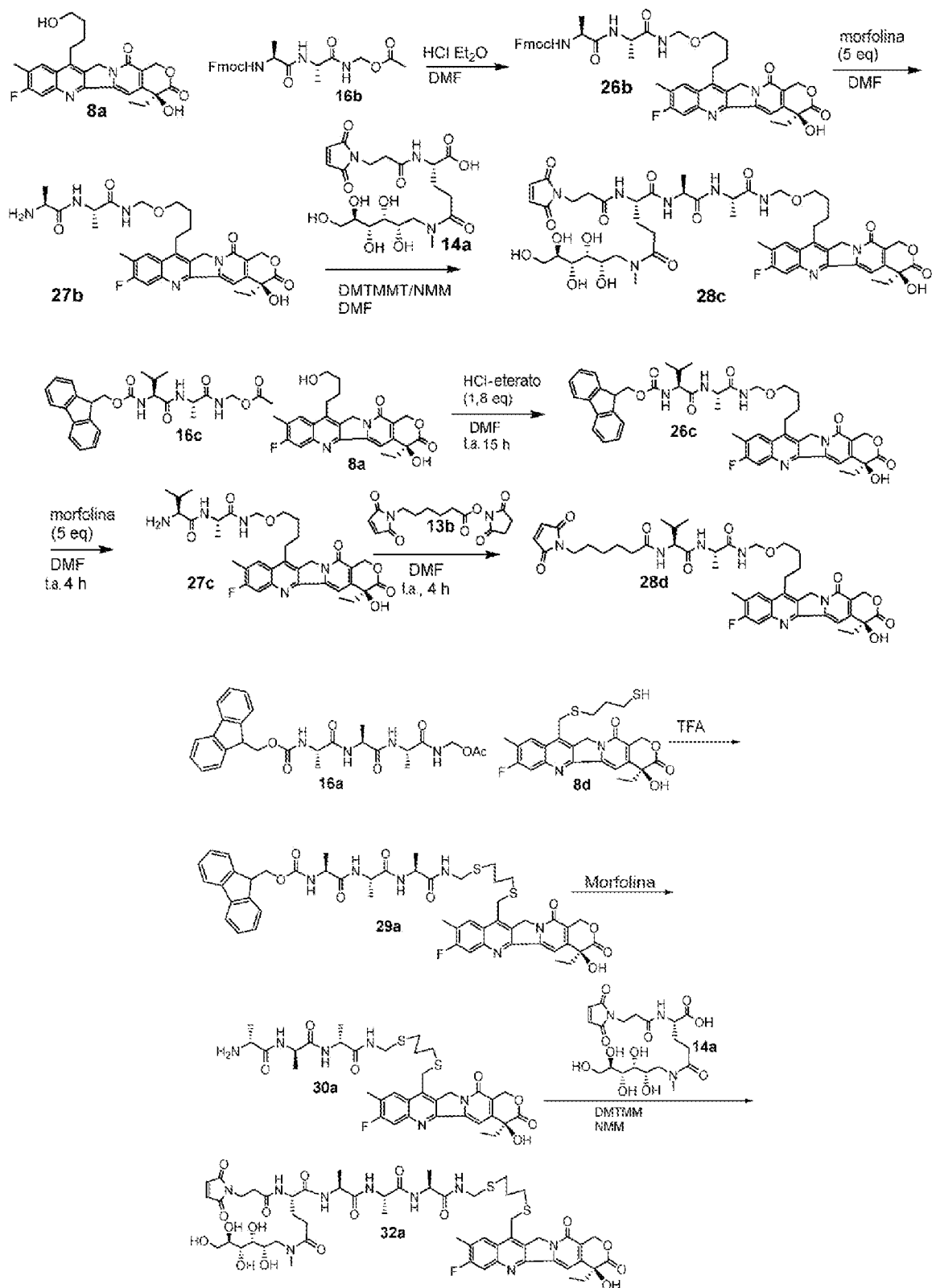


FIG. 8

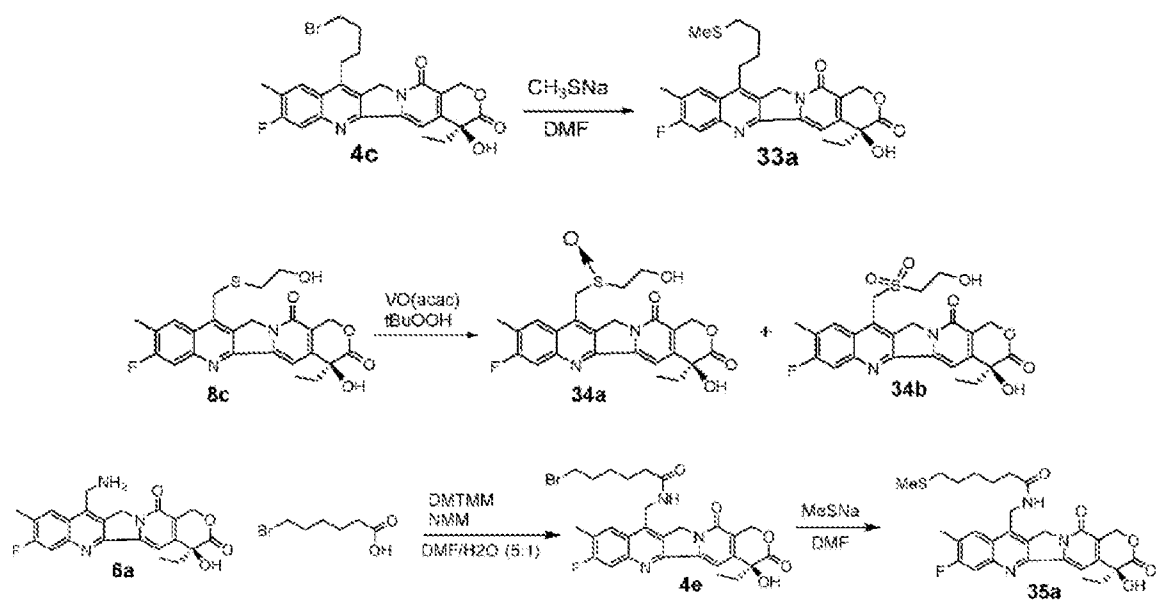


FIG. 9

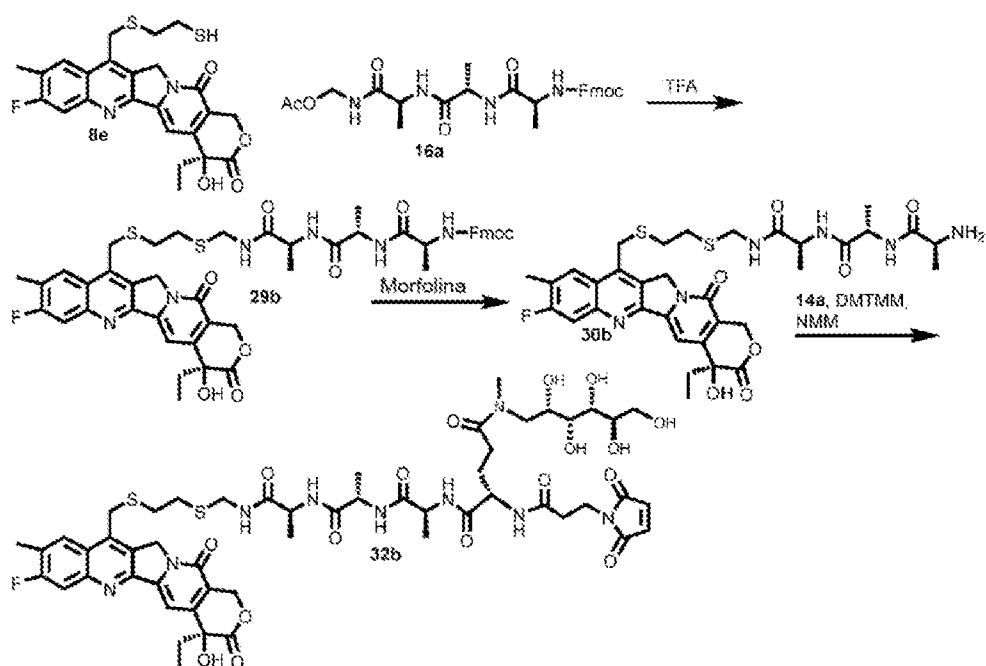


FIG. 10

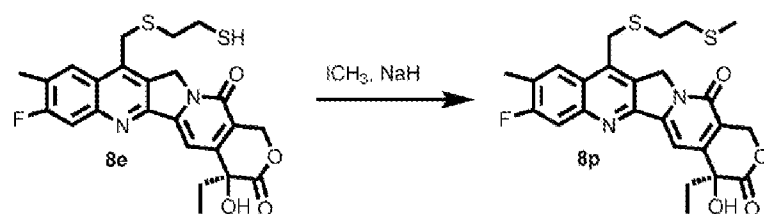


FIG. 11

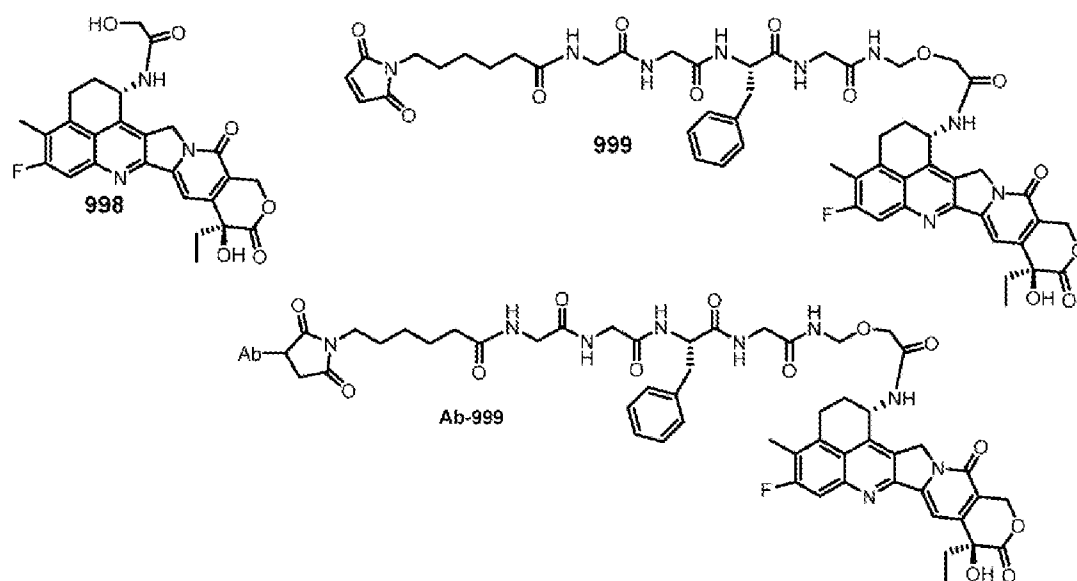


FIG. 12

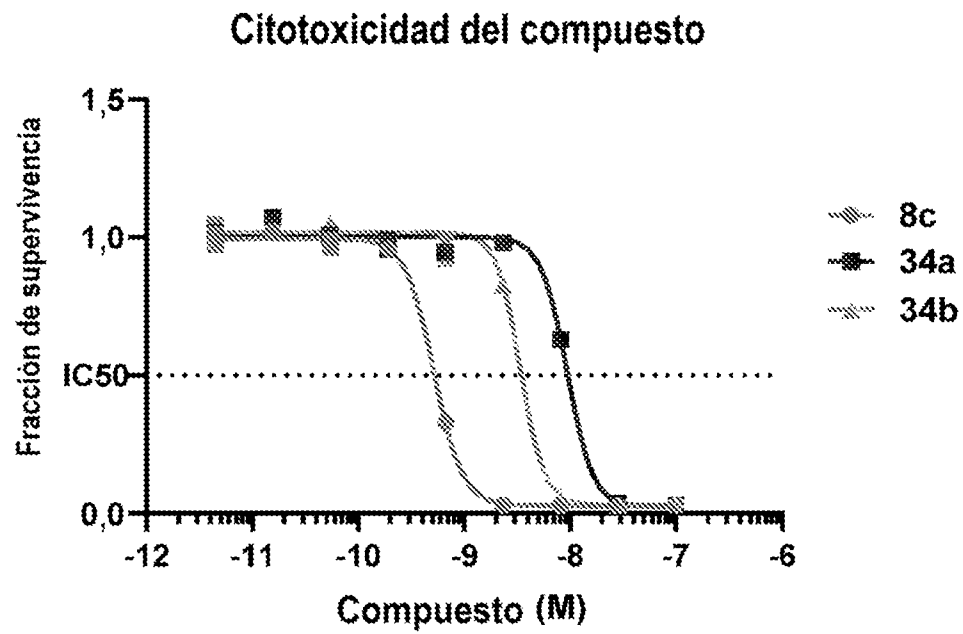


FIG. 13

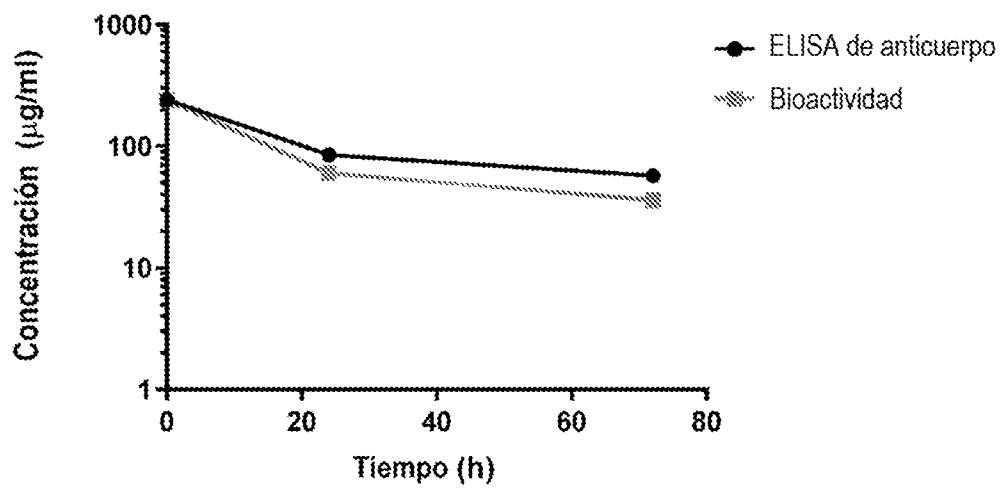
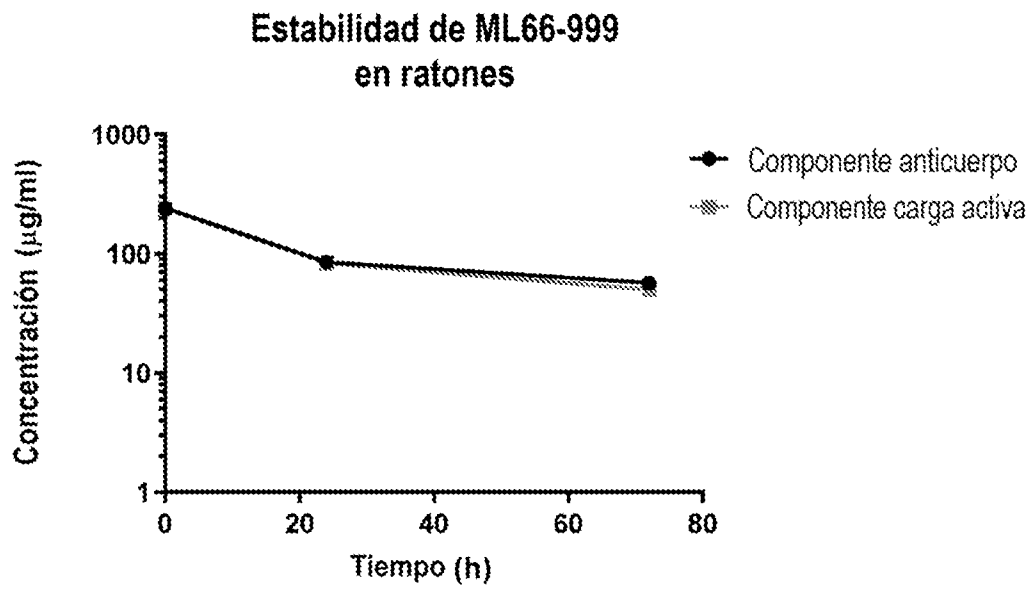


FIG. 14

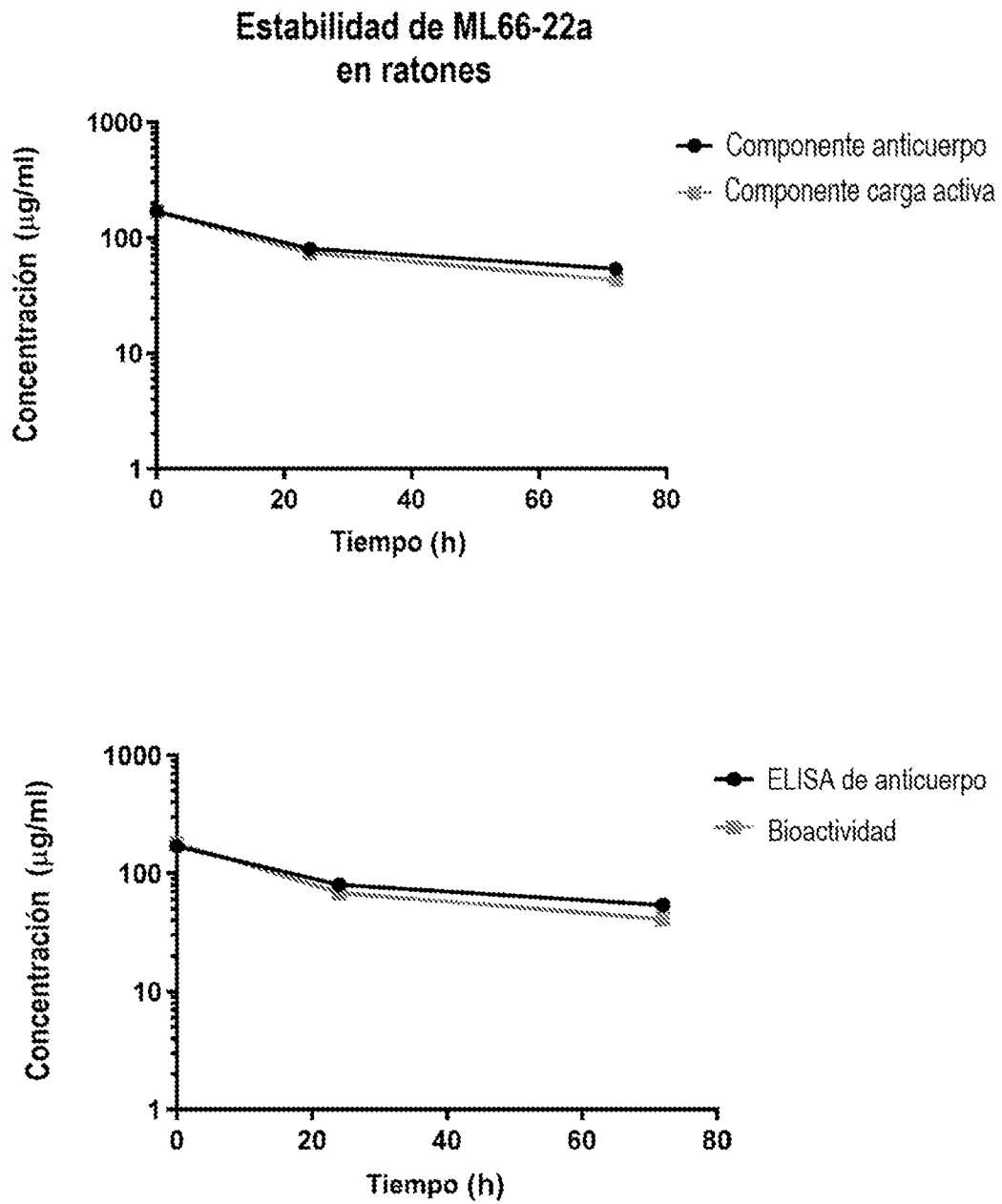


FIG. 15

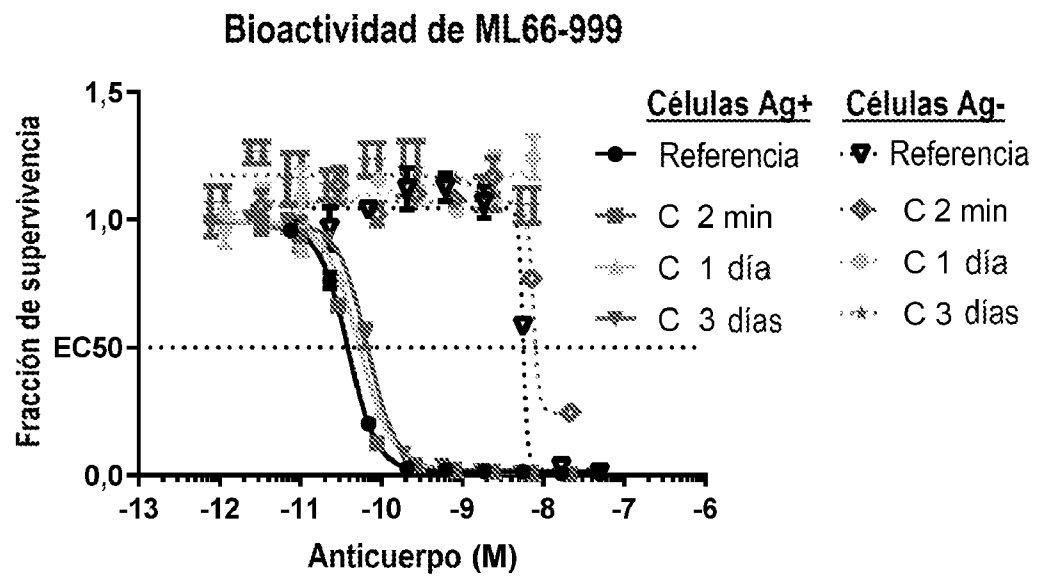


FIG. 16

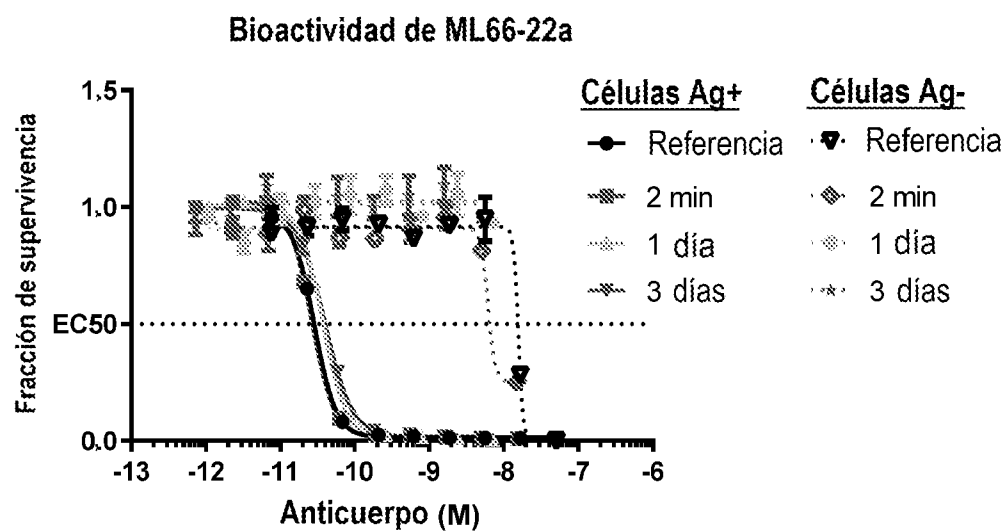


FIG. 17

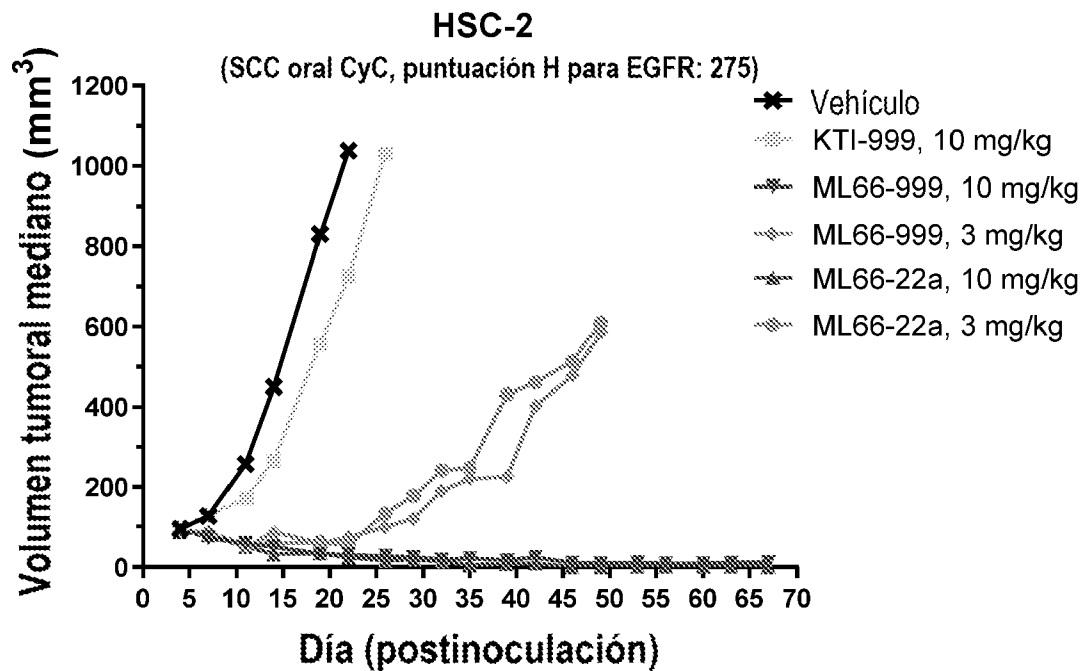


FIG. 18

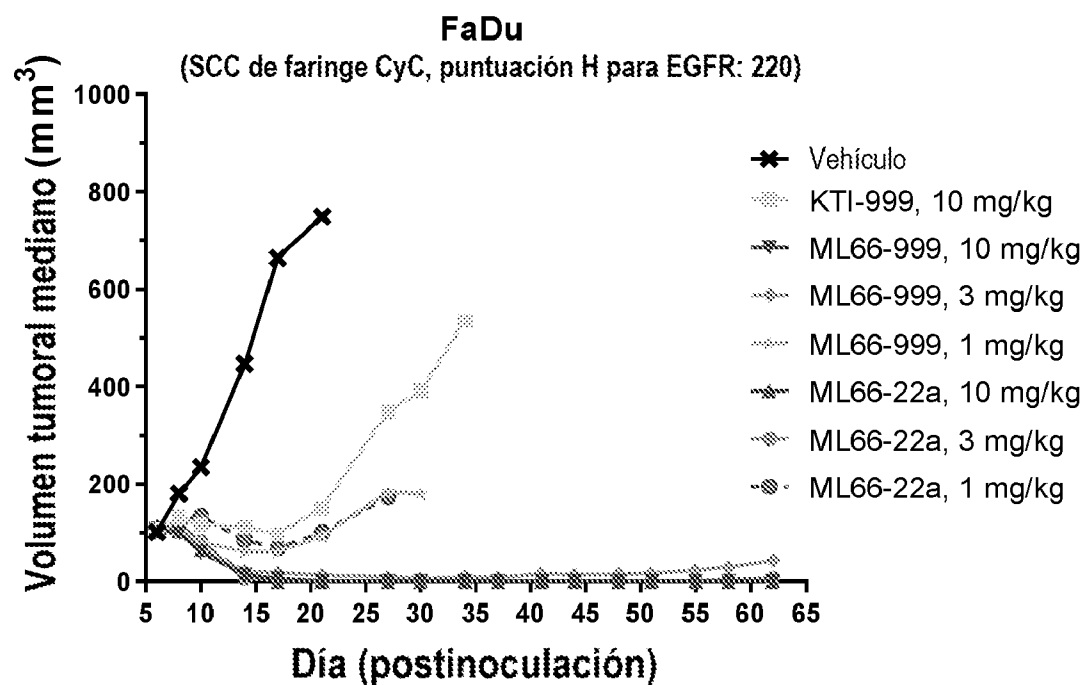


FIG. 19

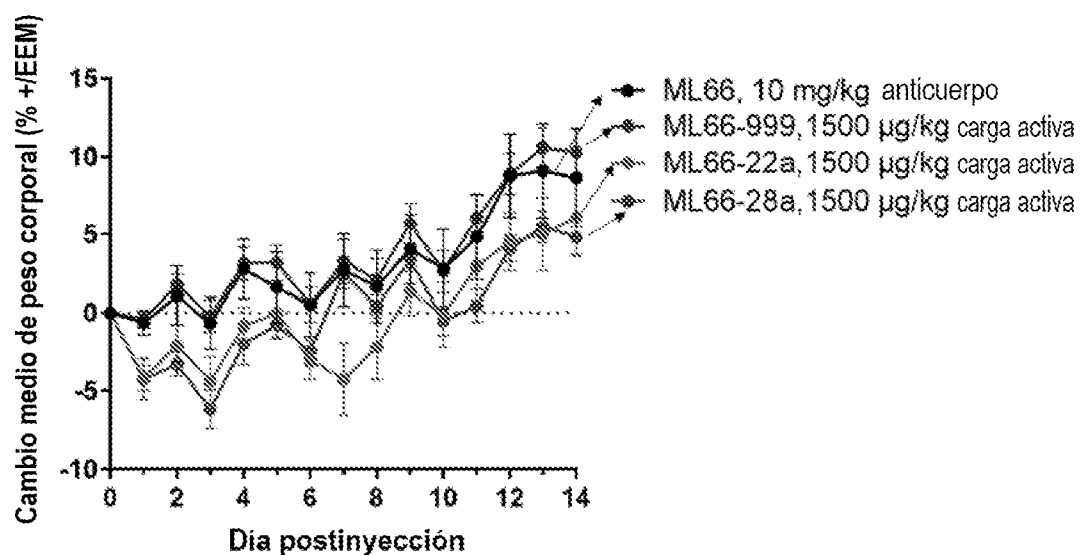


FIG. 20

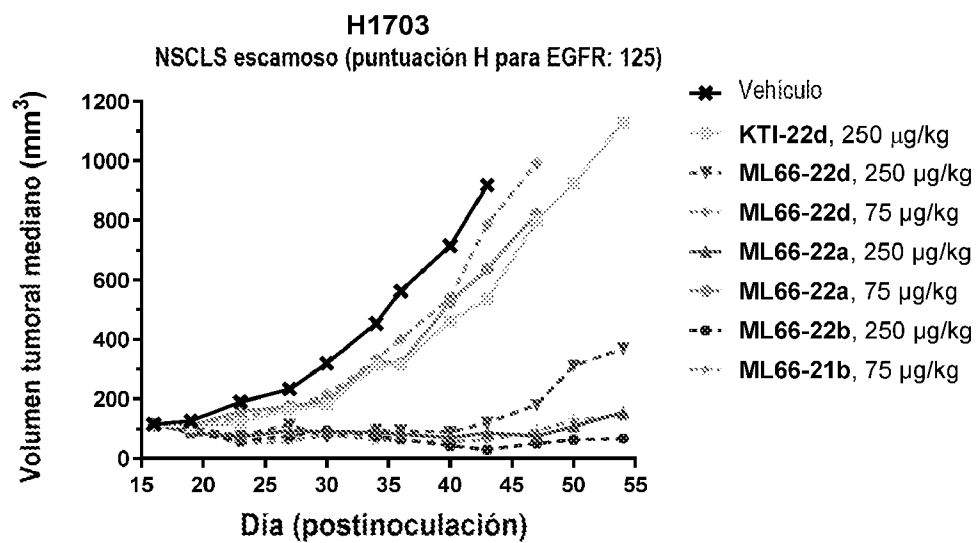


FIG. 21

