

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 807**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 31/5365 (2006.01)
C07D 507/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/029757**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14145090**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14729755 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 2968593**

54 Título: **Moléculas biológicamente activas, conjugados de las mismas y usos terapéuticos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792216 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.02.2025

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.00%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US

72 Inventor/es:

NITTOI, THOMAS

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 2 996 807 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

Moléculas biológicamente activas, conjugados de las mismas y usos terapéuticos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación proporciona conjugados de ligando-molécula biológicamente activa como se define en las reivindicaciones, en donde el ligando está conectado a la molécula biológicamente activa a través de un compuesto enlazador. La presente divulgación también proporciona compuestos conjugados en composiciones farmacéuticas para su uso en diversas aplicaciones terapéuticas.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades proliferativas se caracterizan por el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anómalas. Si la diseminación no se controla, puede provocar la muerte. La proliferación anómala, por ejemplo, un cáncer, es provocada tanto por factores externos (por ejemplo, tabaco, productos químicos, radiación y organismos infecciosos) como por factores internos (mutaciones hereditarias, afecciones del sistema inmunitario, las mutaciones que se producen por el metabolismo). Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover la proliferación anómala. El cáncer se trata mediante cirugía, radiación, quimioterapia, hormonas e inmunoterapia. Sin embargo, existe la necesidad de fármacos antiproliferativos más eficaces.

La terapia antiproliferativa ideal permitiría la administración dirigida de agentes altamente citotóxicos a las células tumorales y no afectaría a las células normales. El tratamiento quimioterápico convencional, por ejemplo, con maitansina, es limitado debido a los efectos secundarios tóxicos que surgen de los efectos del fármaco sobre células no cancerosas. Se han intentado diversos enfoques para el suministro farmacológico dirigido, incluyendo el uso de conjugados de sondas dirigidas a tumores (tales como anticuerpos o factores de crecimiento) con toxinas tales como toxinas de pseudomonas o difteria, que detienen la síntesis de proteínas y células. Sin embargo, los efectos secundarios incluyen la reacción del sistema inmunitario debido a los componentes no humanos de los conjugados. Además, la semivida de los conjugados farmacológicos estaba limitada debido a la eliminación de la circulación a través de la filtración renal y la degradación esquemática, la captación por el sistema reticuloendotelial (RES) y la acumulación en órganos y tejidos no diana.

Otro enfoque usa portadores farmacológicos pasivos, tales como polímeros, liposomas y micelas poliméricas, para aprovechar la hiperpermeabilidad de los endotelios vasculares del tejido tumoral. Los fármacos poliméricos y las macromoléculas se acumulan dentro de los tumores sólidos debido a una permeabilidad mejorada y un mecanismo de retención. Sin embargo, las barreras para usar dichos suministros dirigidos incluyen el aclaramiento rápido de partículas extrañas de la sangre y obstáculos tecnológicos para obtener sistemas de suministro de fármacos farmacéuticamente aceptables y altamente estandarizados con la especificidad y selectividad necesarias para unirse a las células tumorales.

Por lo tanto, existe la necesidad de compuestos antiproliferativos dirigidos.

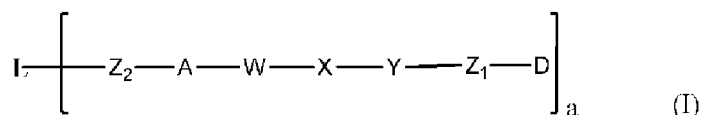
El documento US 2013/029900 A1 divulga un conjugado de agente de unión a células-agente citotóxico que tiene un enlazador peptídico. El documento US 2013/029900 A1 también describe composiciones y métodos para inhibir el crecimiento celular anómalo y tratar un trastorno proliferativo en un mamífero usando el conjugado divulgado en el mismo.

Reddy *et al.* ("Folate Receptor-Specific Antitumor Activity of EC 131, a Folate-Maytansinoid Conjugate", CANCER RESEARCH, vol. 67, n.º 13, 1 de julio de 2007, páginas 6376-6382) describen cómo se preparó EC131, un nuevo conjugado farmacológico dirigido al receptor de folato (FR), uniendo covalentemente la vitamina ácido fólico (FA) a un potente agente inhibidor de microtúbulos, el maitansinoide DM1, a través de un enlace disulfuro intramolecular. Reddy *et al.* también describen la actividad biológica de EC 131.

Davis *et al.* ("In vitro Characterization of the Drug-Drug Interaction Potential of Catabolites of Antibody-Maytansinoid Conjugates", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 40, n.º 10, 29 de junio de 2012, páginas 1927-1934) analizan la caracterización *in vitro* del potencial de inhibición de cuatro especies representativas de maitansinoides observadas en el procesamiento hepático y/o tumoral *in vivo* de conjugados de anticuerpo-maitansina (AMC) con enlaces escindibles y no escindibles.

60 **Sumario de la invención**

En el presente documento se divulgan, pero no según la invención, compuestos conjugados representados por la siguiente fórmula estructural (I):



en donde:

- 5 L está ausente o es un ligando;
además, en donde:

cuando L es un ligando, L es capaz de unirse a una célula o población celular;
a es un número entero de 1 a 10;

- 10 Z₂ y Z₁ están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

D es una molécula biológicamente activa;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

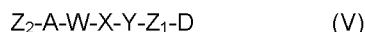
W está ausente, es -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

- 15 además, en donde: R₄, R₅ y R₆ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; y

Y está ausente, o es un espaciador.

- 20 En el presente documento también se divulgan, pero no según la invención, compuestos de enlazadores-biológicamente activos representados por la siguiente fórmula estructural (V):



- 25 en donde:

Z₂ y Z₁ están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

D es una molécula biológicamente activa;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

- 30 W está ausente, es -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

además, en donde: R₄, R₅ y R₆ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; y

- 35 Y está ausente, o es un espaciador.

En el presente documento también se divulgan, pero no según la invención, enlazadores representados por la siguiente fórmula estructural (VI).

- 40 En un aspecto divulgado en el presente documento, pero no según la invención, los compuestos enlazadores se representan por la fórmula (VI):



- 45 en donde:

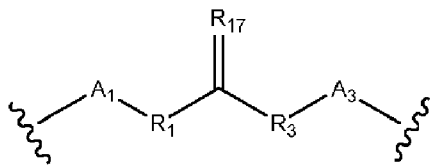
Z₂ y Z₁ están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

W está ausente, es -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

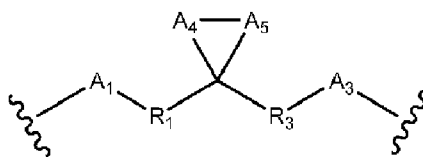
- 50 X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

Y está ausente, es



- 55

o



en donde A_1 , A_3 , R_1 y R_3 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, - CR_5R_6 -, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -S-C(=S)-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

A_4 y A_5 son cada uno independientemente -O-, -S-, -NR₁₈-, -CR₅R₆-;

R_{17} se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

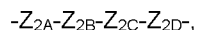
R_{18} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

p_1 , p_2 y p_3 son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100; y

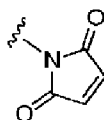
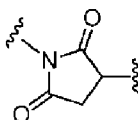
x es 0, 1 o 2.

En el presente documento también se divulgan, pero no según la invención, compuestos de fórmula (VI), en donde Z_2 se representa mediante la siguiente fórmula estructural:



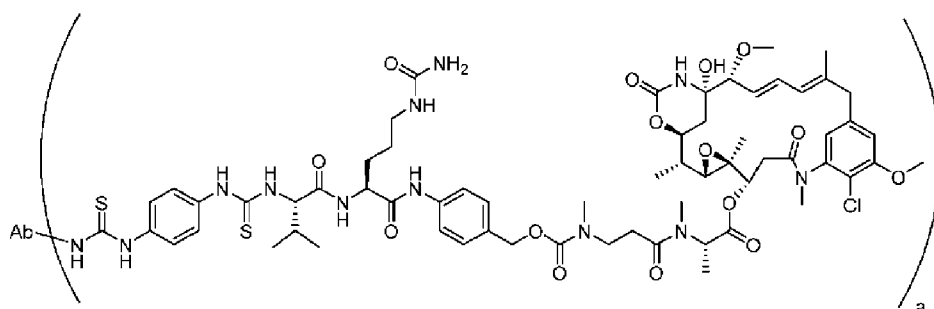
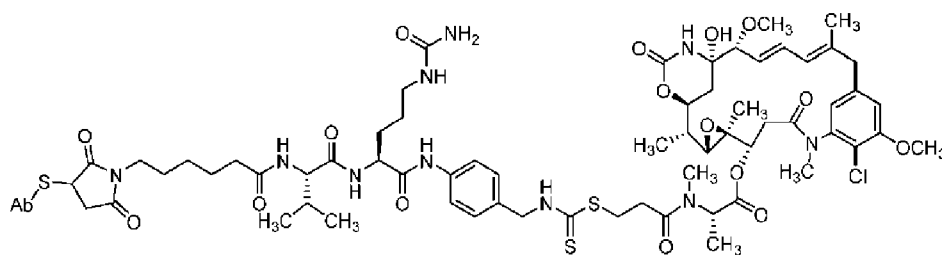
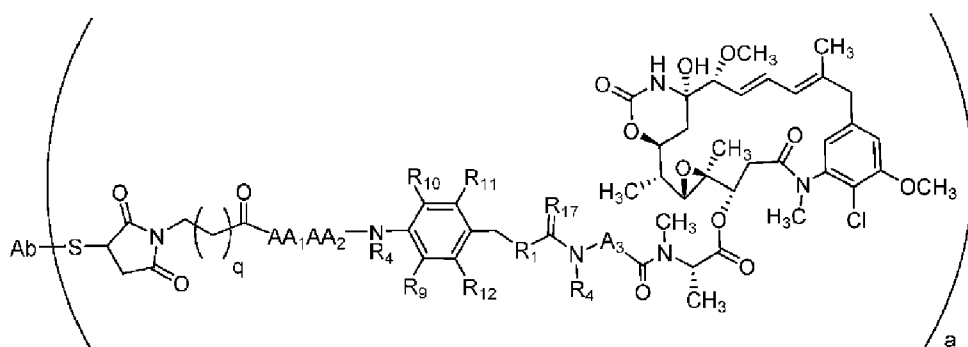
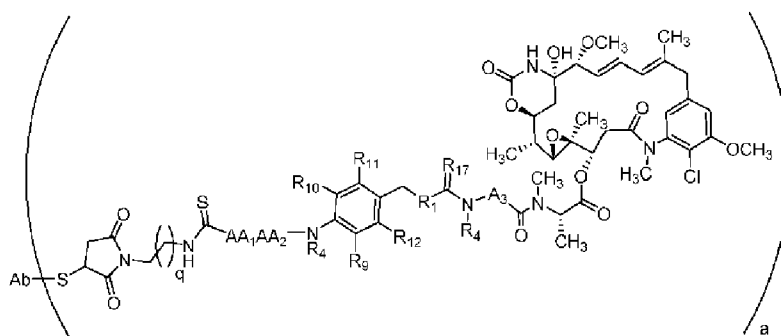
en donde:

Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} y Z_{2D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, - CR_5R_6 -, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄)-, -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,



, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



en donde:

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

AA₁-AA₂ es un residuo peptídico seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina y asparagina-alanina;

a es un número entero de 1 a 10;

q es 0 o un número entero de 1 a 5;

R₁ es un residuo de aminoácido, un residuo peptídico que tiene 2-20 residuos de aminoácidos, un -alquileo-, un -alquinileo-, un -alquenileo-, un -cicloalquileo-, un -arileo-, un -heteroarileo-, un -heterociclileo-, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH₂)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH₂)_{p1}-, -(CH₂)_{p1}-C(=O)-, -(CH₂)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -

SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)- u -O-C(=O)-NR₄-, en donde el -alquileo-, -alquinileo-, alquenileo-, -cicloalquileo-, -arileo-, heteroarileo- y -heterociclileo- están opcionalmente sustituidos;

A₃ es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂- o -CH₂CH₂CH₂CH₂-;

R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈ o CR₅R₆;

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocicliilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterocicliilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o un alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterocicliilo sustituidos o sin sustituir;

R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, halógeno, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃R₁₄ o alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterocicliilo sustituidos o sin sustituir;

R₁₃ y R₁₄ son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido;

R₁₅ es un alquilo opcionalmente sustituido;

p1, p2 y p3 son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100; y

x es 0, 1 o 2.

La presente divulgación también se refiere una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto del primer aspecto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente divulgación también proporciona un compuesto del primer aspecto para su uso en la reducción, retraso o detención de un crecimiento celular anómalo.

La presente divulgación también proporciona un compuesto del primer aspecto para su uso en la destrucción de una célula.

La presente divulgación también proporciona un compuesto del primer aspecto para su uso en el tratamiento de un trastorno médico en un individuo.

La presente divulgación también proporciona un compuesto del primer aspecto para su uso en la reducción del tamaño de un tumor, la detención del aumento del tamaño de un tumor, la reducción de la proliferación de un tumor o la prevención de la proliferación de un tumor en un individuo que lo necesite.

En el presente documento también se divulgan, pero no según la invención, compuestos precursores de moléculas biológicamente activas-enlazadores, como se representa por la fórmula (V). Los compuestos de fórmula (V) proporcionan componentes básicos para compuestos conjugados de fórmula (I). Además, los compuestos de fórmula (V) pueden proporcionarse como composiciones, composiciones farmacéuticas y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Las **figuras 1-8** representan los resultados de los ensayos de viabilidad celular en los que se cultivaron *in vitro* diversas líneas de células cancerosas y se trataron con diluciones en serie de anticuerpos, fármaco libre o conjugados de anticuerpo-fármaco como se muestra. El porcentaje de viabilidad se determinó de acuerdo con los métodos expuestos en el Ejemplo 14.

La **figura 1A** muestra los resultados de viabilidad celular de células C4-2 (línea celular de cáncer de próstata) tratadas con el compuesto 2, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 3 ("Control de isotipo-3"), anticuerpo anti PSMA conjugado con el compuesto 3 ("PSMA-3") y anticuerpo anti PSMA no conjugado ("PSMA").

La **figura 1B** muestra los resultados de viabilidad celular de células C4-2 (línea celular de cáncer de próstata) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti PSMA conjugado con el compuesto 7 ("PSMA-7") y anticuerpo anti PSMA no conjugado ("PSMA").

La **figura 1C** muestra los resultados de viabilidad celular de células C4-2 (línea celular de cáncer de próstata) tratadas con el compuesto 25, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 21 ("Control de isotipo-21"), anticuerpo anti PSMA conjugado con el compuesto 21 ("PSMA-21") y anticuerpo anti PSMA no conjugado ("PSMA").

La **figura 2** muestra los resultados de viabilidad celular de células PC3/hSTEAP1 (línea celular de cáncer de próstata que expresa hSTEAP1 exógena) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti STEAP1 conjugado con el compuesto 7 ("STEAP1-7") y anticuerpo anti STEAP1 no conjugado ("STEAP1").

La **figura 3** muestra los resultados de viabilidad celular de células T47D (línea celular de cáncer de mama) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti PRLR conjugado con el compuesto 7 ("PRLR-7") y anticuerpo anti PRLR no conjugado ("PRLR").

La **figura 4** muestra los resultados de viabilidad celular de células HEK293/hEGFRvIII (células HEK293 que expresan hEGFRvIII exógena) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti EGFRvIII conjugado con el compuesto 7 ("EGFRvIII-7") y anticuerpo anti EGFRvIII no conjugado ("EGFRvIII").

La **figura 5** muestra los resultados de viabilidad celular de células MMT/hEGFRvIII (células MMT que expresan hEGFRvIII exógena) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti EGFRvIII conjugado con el compuesto 7 ("EGFRvIII-7") y anticuerpo anti EGFRvIII no conjugado ("EGFRvIII").

La **figura 6** muestra los resultados de viabilidad celular de células U251/hEGFRvIII (células U251 que expresan hEGFRvIII exógena) tratadas con el compuesto 6, anticuerpo de control de isotipo conjugado con el compuesto 7 ("Control de isotipo-7"), anticuerpo anti EGFRvIII conjugado con el compuesto 7 ("EGFRvIII-7") y anticuerpo anti EGFRvIII no conjugado ("EGFRvIII").

La **figura 7, paneles A y B**, muestra los resultados de viabilidad celular de células HEK293 y U87MG, respectivamente, tratadas con los compuestos 6, 27, 29 y 31 (todos sin conjugar).

La **figura 8, paneles A-E**, muestra los resultados de viabilidad celular de células HEK293, U251, C4-2, PC3 y MMT, respectivamente, tratadas con los compuestos 6, 9, 33 y 35 (todos sin conjugar).

Descripción detallada

Las referencias a determinados ejemplos que se hacen en la siguiente descripción se consideran ilustrativas únicamente de los principios de la divulgación.

Las palabras "comprender", "que comprende", "incluir" e "que incluye" cuando se usan en esta memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones tienen la intención de especificar la presencia de las características, números enteros, componentes o etapas indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, componentes o etapas adicionales de los mismos.

Los términos generales usados en cualquiera de los ejemplos del presente documento se pueden definir de la siguiente manera; sin embargo, el significado indicado no debe interpretarse como limitante del alcance del término *per se*.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a un compuesto que tiene un ligando, un enlazador y una molécula biológicamente activa. Los ejemplos ilustrativos incluyen compuestos de fórmula (I), (III) y (IV).

Como se usa en el presente documento, el término "espaciador" se refiere a los componentes químicos básicos del enlazador usados para separar espacialmente el ligando de la molécula biológicamente activa y permitir el catabolismo del enlazador dentro de las células. Un espaciador se puede representar por Z_1 y Z_2 .

Como se usa en el presente documento, el término "macróido" se refiere a cualquier molécula biológicamente activa que tenga un anillo macróido.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo que tiene una fórmula general C_nH_{2n+1} . Los ejemplos de alquilo incluyen: metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo y similares. Los alquilos típicos tienen de uno a diez átomos de carbono, de uno a nueve átomos de carbono, de uno a ocho átomos de carbono, de uno a siete átomos de carbono, de uno a seis átomos de carbono, de uno a cinco átomos de carbono, de uno a cuatro átomos de carbono, de uno a tres átomos de carbono, de uno a dos átomos de carbono o un átomo de carbono.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un hidrocarburo aromático monovalente o policíclico que típicamente tiene de 6 a 18 átomos de carbono. Los ejemplos de arilo incluyen fenilo (como benceno), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, indenilo, tetrahidronaftilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado alifático de dos o más átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación. Los alquenos tienen una fórmula general de $R_2C=CR_2$. Los ejemplos de alqueno incluyen: etilenilo, vinilo, alilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo alifático univalente que contiene un triple enlace. Los alquinos típicos tienen de dos a veinte átomos de carbono (e incluyen al menos un triple enlace). Los ejemplos de alquino incluyen etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, hexinilo y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un radical anular carbocíclico saturado monovalente. Los cicloalquilos típicos son radicales anulares monocíclicos de 3 a 7 miembros. Un ejemplo de un cicloalquilo es ciclohexilo.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5 o 6 miembros. El heteroarilo incluye sistemas anulares condensados (al menos uno debe ser aromático) que incluyen hasta 5 a 18 átomos, que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de

nitrógeno, azufre u oxígeno. Los heteroarilos ilustrativos son piridinilo, triazolilo, furilo, pirazinilo, tienilo, isoxazolilo, indazolilo, furazanilo, benzotiazolilo, quinazolinilo y furopiridinilo.

Como se usa en el presente documento, el término "heterociclilo" se refiere a un radical carbocíclico saturado o parcialmente saturado, típicamente de 3 a 18 átomos de carbono en el que al menos un átomo anular es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. Un heterociclilo puede ser un monociclo o un biciclo, por ejemplo. Los ejemplos de heterociclilo son pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidropiranilo, tiofanilo, 2H-piranilo, dioxanilo, ditianilo, piperidino y similares.

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

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

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

Ligandos y compañeros de unión

Los compuestos conjugados que no comprenden un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, no están incluidos por las reivindicaciones y son solamente para fines de referencia.

La eficacia de los ejemplos de compuestos conjugados descritos en el presente documento depende de la selectividad del ligando para unirse a su compañero de unión a ligando.

En un ejemplo, los ligandos son cualquier molécula capaz de unirse con determinada especificidad a un compañero de unión dado dentro de un mamífero donde la interacción puede dar como resultado un uso terapéutico. En algunos ejemplos, el ligando es capaz de unirse a una célula o población celular.

Los ligandos para su uso en el presente documento incluyen anticuerpos, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, receptores víricos, interleucinas o cualquier otra molécula o sustancia de unión celular o de unión a péptidos.

En un ejemplo, el ligando es un anticuerpo. Como se define en el presente documento, anticuerpo se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (Fab, Fab' y F(ab)₂, minicuerpos, diacuerpos, tricuerpos y similares) y anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos del presente documento se pueden humanizar usando métodos descritos en la Patente de EE. UU. N.º 6.596.541 y la Publicación de EE. UU. N.º 2012/0096572.

Cuando el ligando es un anticuerpo, se une a un compañero de unión a antígeno que es un polipéptido y puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o un factor de crecimiento. Los antígenos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante tiroidea; lipoproteínas; alfa1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor vmc, factor IX, factor tisular (TF) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulación por activación normalmente expresada y secretada por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (M1P-1-alfa); una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora de muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; 19E; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tales como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2), factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento insulínico 1 y II (IGF-1 y IGF-II); des(I-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, receptores EphA, receptores EphB, receptor de folato, FOLR1, mesotelina, cripto, alphavbeta6, integrinas, VEGF, VEGFR, EGFR, receptor de transferrina, 1RTA1, 1RTA2, 1RTA3, 1RTA4, 1RTA5; proteínas CD, tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152, o un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumores o receptores de superficie celular divulgados en la Publicación de EE. UU. N.º 2008/0171040 o la Publicación de EE. UU. N.º 2008/0305044; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de la membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del VIH; proteínas transportadoras; receptores de direccionamiento; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD118, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como AFP, ALK, B7H4, proteínas BAGE, β -catenina, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (anhidrasa carbónica IX), caspasa-8, CD20, CD40, CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, c-kit, cMET, CTLA4, ciclina-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, endoglin, Epcam, EphA2, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1, 2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1, 2, 3, 4, 6 y 12), MART-1, mesotelina, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NGEP, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, STn, survivina, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, tirosinasa y uroplaquina-3, y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los ligandos también pueden incluir proteínas de repetición de anquirina, interferones, linfocinas tales como IL-2 o IL-3, hormonas como insulina y glucocorticoides, factores de crecimiento tales como EGF, transferrina, fibronectina tipo III, etc.

Los ejemplos del presente documento son específicos de una diana para uso terapéutico. En un ejemplo, los ligandos se preparan para interactuar con y unirse a antígenos definidos como antígenos tumorales, que incluyen antígenos específicos para un tipo de tumor o antígenos que se comparten, se sobreexpresan o se modifican en un tipo particular de tumor. Los ejemplos incluyen: alfa-actinina-4 con cáncer de pulmón, ARTC1 con melanoma, proteína de fusión BCR-ABL con leucemia mieloide crónica, B-RAF, CLPP o Cdc27 con melanoma, CASP-8 con carcinoma de células escamosas y hsp70-2 con carcinoma de células renales, así como los siguientes antígenos específicos de tumor compartidos, por ejemplo: BAGE-1, GAGE, GnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2.

Moléculas biológicamente activas

Los compuestos conjugados o compuestos que no comprenden un maitansinoide no están incluidos por las reivindicaciones y son solamente para fines de referencia.

Las moléculas biológicamente activas en el presente documento incluyen cualquier molécula que tenga un uso terapéutico en un mamífero. En ejemplos típicos, la molécula se suministra de forma beneficiosa a una diana dentro del mamífero y, en particular, se suministra de forma beneficiosa a una célula y a continuación dentro de ella (por ejemplo, endocitosis) en comparación con las moléculas liberadas en los sistemas vascular o linfático.

En un ejemplo, las moléculas biológicamente activas son compuestos que dan como resultado la inhibición, el retraso, la reducción y/o la prevención del crecimiento celular. Las moléculas biológicamente activas también pueden dar como resultado la muerte celular a través de necrosis o apoptosis. Las moléculas biológicamente activas ilustrativas para su uso en compuestos conjugados descritos en el presente documento incluyen: maitansinoides (por ejemplo, DM1, DM4, etc.), auristatinas (por ejemplo, MMAE, MMAD, MMAF, etc.), duocarmicina (por ejemplo, MGBA), dolastatina, toxoides y otros fármacos quimioterápicamente eficaces.

Otros ejemplos específicos de moléculas biológicamente activas incluyen, por ejemplo, 1-deshidrotestosterona, 2-pirrolinodoxorrubicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, antraciclina, antramicina (AMC), bleomicina, busulfán, caliqueamicinas, carmustina cisplatino, colchicina, cianomorfolino-doxorrubicina, ciclofosfamida, citarabina, citocalasina B, dactinomicina, daunorrubicina, decarbazina, dibromomanitol, dihidroxiantracindiona, doxorrubicina, emetina, epirubicina, bromuro de etidio, etopósido, gramicidina D, glucocorticoides, lidocaína, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, morfolino-doxorrubicina, procaína, propranolol, puromicina, pirrolobenzodiazapinas, sibiromicina,

estreptozotocina, taxol, tenopósido, tetracaína, tioepa clorambucilo, tricotecenos, tubulisina, vincristina y estereoisómeros, isómeros, análogos o derivados de cualquiera de los anteriores.

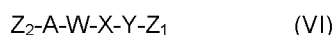
En un ejemplo, la molécula biológicamente activa es un maitansinoide o un análogo de maitansinoide. Los maitansinoides de ejemplo para su uso en el presente documento se describen en Widdison *et al.*, J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408.

Materiales enlazadores

La presente divulgación incluye un compuesto enlazador que es químicamente capaz de unir covalentemente dos restos químicos espaciados. El enlazador espacia y une dos restos, por ejemplo, el enlazador puede unir un ligando y una molécula biológicamente activa. En un ejemplo, el enlazador es autoinmolativo, en donde el enlazador conecta dos o más restos químicos diferentes y libera al menos uno de dichos restos químicos en presencia de una enzima. En otro ejemplo, el enlazador puede estar unido a otros restos químicos, incluyendo, pero sin limitación, agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, marcadores detectables, agentes de diagnóstico y similares. En un ejemplo, el enlazador une una molécula biológicamente activa y un ligando. En otro ejemplo, el enlazador une un macróido biológicamente activo y un ligando. En otro ejemplo más, el enlazador une un macróido biológicamente activo y un anticuerpo, o fragmentos del mismo.

En un ejemplo, los enlazadores son útiles para unir covalentemente ligandos con agentes terapéuticos y marcadores. En otro ejemplo, los enlazadores mejoran la estabilidad química y/o sistémica de los restos unidos. En otro ejemplo, los enlazadores reducen la toxicidad *in vivo* de los restos unidos. En otro ejemplo, los enlazadores mejoran la farmacocinética, la farmacodinámica y/o la biodisponibilidad de los restos unidos. En un ejemplo, los enlazadores escinden y liberan una molécula biológicamente activa en un sitio en o cerca de una célula diana o una población celular en una forma farmacológicamente eficaz. En un ejemplo, la escisión se realiza mediante enzimas. En un ejemplo, los grupos escindibles en los enlazadores para la escisión enzimática incluyen, pero sin limitación, enlaces peptídicos, enlaces éster y enlaces disulfuro. En otro ejemplo, el enlazador se escinde a través de cambios de pH.

En un ejemplo, los compuestos enlazadores se representan por la fórmula (VI):



en donde:

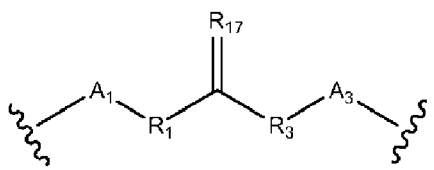
Z_2 y Z_1 están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

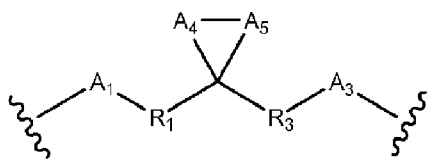
W está ausente, es $-O-$, $-S-$, $-CR_5R_6-$, $-NR_4-$;

X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

Y está ausente, es



o



en donde A_1 , A_3 , R_1 y R_3 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_2)_{p1}-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-(CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

A_4 y A_5 son cada uno independientemente $-O-$, $-S-$, $-NR_{18}-$, $-CR_5R_6-$;

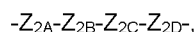
R_{17} se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

R_{18} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

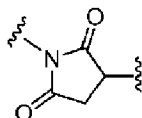
p_1 , p_2 y p_3 son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100; y x es 0, 1 o 2.

En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (VI), en donde Z_2 se representa mediante la siguiente fórmula estructural:

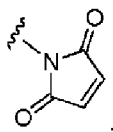


en donde:

Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} y Z_{2D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, - CR_5R_6- , -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄)-, -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,

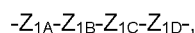


o



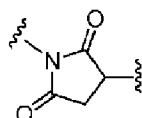
en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (VI), en donde Z_1 se representa mediante la siguiente fórmula estructural:

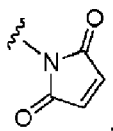


en donde:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} y Z_{1D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, - CR_5R_6- , -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄)-, -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,



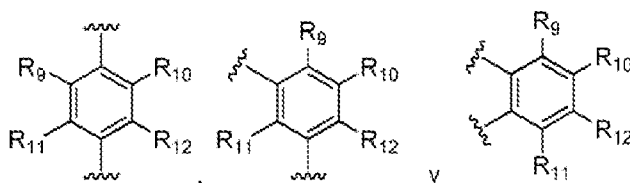
o



en donde el alquilo, alquinilo, alquenoilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

- 5 En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (VI), en donde A es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina, cisteína y citrulina.
- 10 En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (VI), en donde A es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina.
- 15

En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (VI), en donde X es un arilo seleccionado del grupo que consiste en



- 20 en donde R_9 , R_{10} , R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, un alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, $NR_{13}R_{14}$, nitro, ciano, $-OH$, $-O-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-O-R_{15}$, $-C(=O)-NR_{13}R_{14}$; y además, en donde, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; R_{13} y R_{14} son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y R_{15} es un alquilo opcionalmente sustituido.
- 25

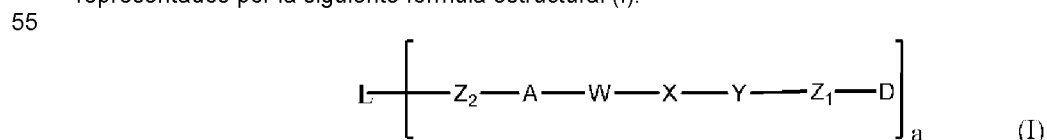
- De acuerdo con determinados ejemplos, los enlazadores, las moléculas biológicamente activas y otros compuestos de la presente divulgación se pueden conectar a un anticuerpo o molécula de unión a antígeno a través de una unión en un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno. Las uniones de aminoácidos de ejemplo que se pueden usar en el contexto de la divulgación incluyen, por ejemplo, lisina (véase, por ejemplo, los documentos US 5208020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; los documentos WO 2005/089808; US 5.714.586; US 2013/0101546; y US 2012/0585592), cisteína (véanse, por ejemplo, los documentos US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; y US 7.750.116), selenocisteína (véanse, por ejemplo, el documento WO 2008/122039; y Hofer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 2008, 105:12451-12456), formilglicina (véase, por ejemplo, Carrico *et al.*, Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., 2013, 110:46-51, y Rabuka *et al.*, Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067), aminoácidos no naturales (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2013/068874 y WO 2012/166559), y aminoácidos ácidos (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/05982). Los enlazadores también se pueden conjugar con una proteína de unión a antígeno mediante la unión a carbohidratos (véanse, por ejemplo, el documento US 2008/0305497, y Ryan *et al.*, Food & Agriculture Immunol., 2001, 13:127-130) y enlazadores disulfuro (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, y Shaunak *et al.*, Nat. Chem. Biol., 2006, 2:312-313).
- 30
- 35
- 40

- De acuerdo con determinados ejemplos diferentes, los enlazadores, las moléculas biológicamente activas, tales como fármacos, se pueden conectar a un anticuerpo o molécula de unión a antígeno a través de una unión en un aminoácido particular dentro del anticuerpo o molécula de unión a antígeno formando un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).
- 45

Compuestos

- 50 Los compuestos conjugados o compuestos que no están incluidos por las reivindicaciones son solamente para fines de referencia.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona conjugados de moléculas biológicamente activas y ligandos representados por la siguiente fórmula estructural (I):



en donde:

L está ausente o es un ligando;
además, en donde:

cuando L es un ligando, L es capaz de unirse a una célula o población celular;

a es un número entero de 1 a 10;

Z₂ y Z₁ están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

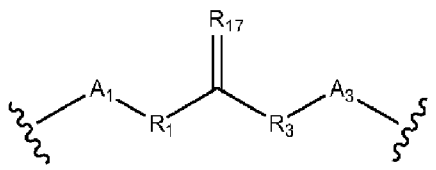
D es una molécula biológicamente activa;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

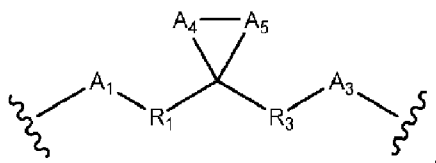
W está ausente, es -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

Y está ausente, es



o



en donde A₁, A₃, R₁ y R₃ están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

A₄ y A₅ son cada uno independientemente -O-, -S-, -NR₁₈-, -CR₅R₆-;

R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

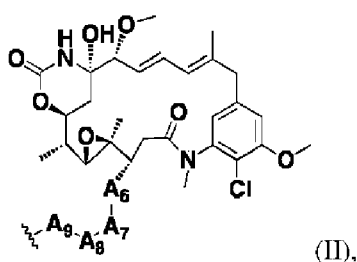
R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

p₁, p₂ y p₃ son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100; y

x es 0, 1 o 2.

En otro ejemplo, la presente divulgación se refiere a compuestos donde la molécula biológicamente activa es un macrólido biológicamente activo citotóxico.

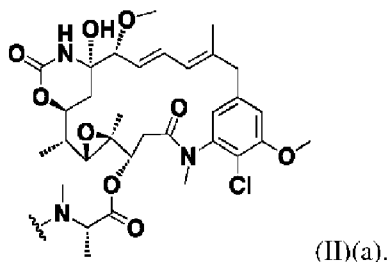
En otro ejemplo más, la presente divulgación proporciona maitansinoides como se representa por la fórmula (II) como macrólidos biológicamente activos:



en donde A₆, A₇, A₈, A₉ están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, aminoácido N-alquilo, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquenilo, un alquinilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un

heterociclilo, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{O}-)_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4$, además, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

En otro ejemplo, el maitansinoide se representa por la siguiente fórmula estructural (II)(a):



En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde el ligando (L) es capaz de unirse a una población celular dirigida específicamente.

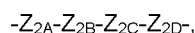
En otro ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde el ligando (L) se selecciona del grupo que consiste en proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos, armazones de unión a antígeno y carbohidratos.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde el ligando (L) es un anticuerpo, o un fragmento del mismo.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde el ligando (L) es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor.

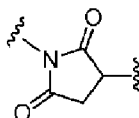
En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde el anticuerpo, o un fragmento del mismo, comprende un grupo azufre que está unido covalentemente con Z_2 .

En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde Z_2 se representa mediante la siguiente fórmula estructural:

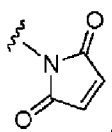


en donde:

Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} y Z_{2D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{O}-)_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$,



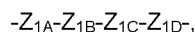
o



en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

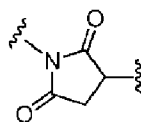
En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde el anticuerpo, o un fragmento del mismo, comprende un grupo azufre que está unido covalentemente con Z_{2A}.

- 5 En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde Z₁ se representa mediante la siguiente fórmula estructural:



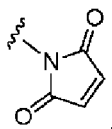
- 10 en donde:

- 15 Z_{1A}, Z_{1B}, Z_{1C} y Z_{1D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquínilo, un alquénilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-(CH₂)_{p2}-, -O-(CH₂)_{p2}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)-O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-N(R₄)-, -O-C(=S)-N(R₄)-, -C(=S)-N(R₄)-, -N=C=S, -N=C=O,



- 20

o



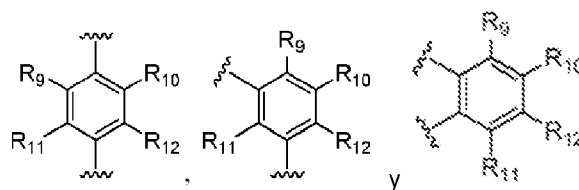
- 25 en donde el alquilo, alquínilo, alquénilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquénilo, alquínilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

- 30 En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde la molécula biológicamente activa (D) está unida covalentemente con Z₁.

- 35 En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde A es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano, tirosina, cisteína y citrulina.

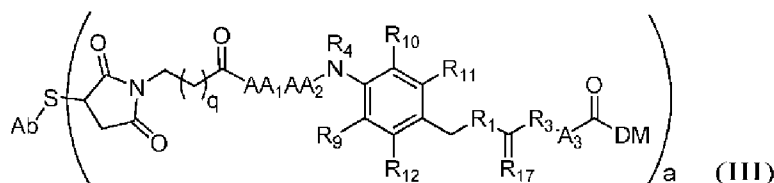
- 40 En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde A es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina.

- 45 En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (I), en donde X es un arilo seleccionado del grupo que consiste en



- 50 en donde R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, un alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃ R₁₄; y además, en donde, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; R₁₃ y R₁₄ son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y R₁₅ es un alquilo opcionalmente sustituido.

En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (III):



en donde:

Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo;

AA₁-AA₂ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

a es un número entero de 1 a 10;

q es 0 o un número entero de 1 a 5;

A₃, R₁ y R₃ están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -(CH₂)_{p2}-O-_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

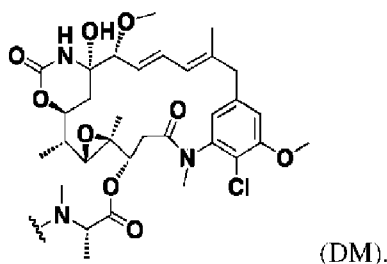
R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, halógeno, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃R₁₄, uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

R₁₃ y R₁₄ son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y R₁₅ es un alquilo opcionalmente sustituido;

p₁, p₂ y p₃ son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100;

x es 0, 1 o 2; y DM se representa por la siguiente estructura (por ejemplo, compuesto de fórmula (II)(a)):



En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (III) en donde:

q es 4;

R₁ y R₃ son cada uno independientemente -O-, -S-, NR₄, -CR₅R₆;

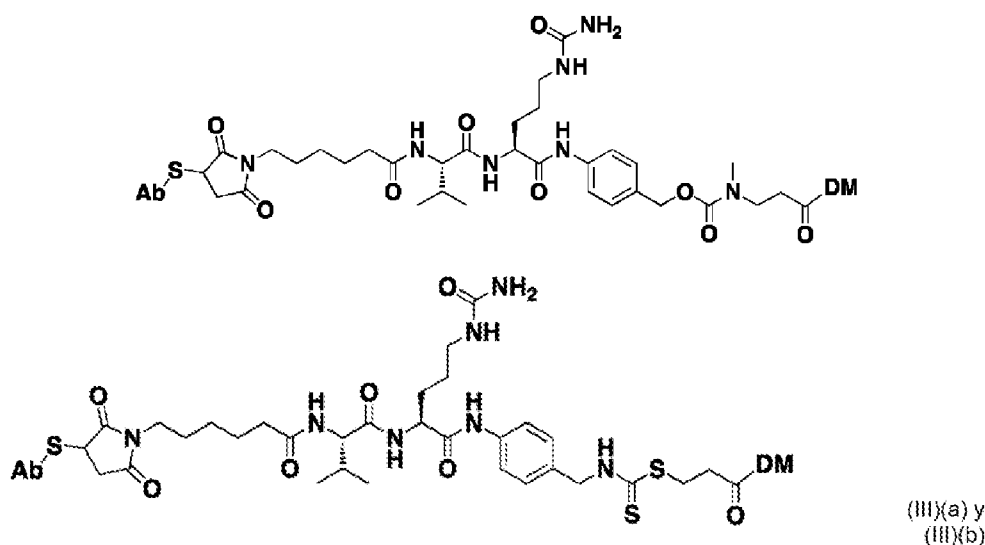
R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R₄, R₅, R₆, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ son cada uno independientemente H o alquilo; y

A₃ es un alquilo.

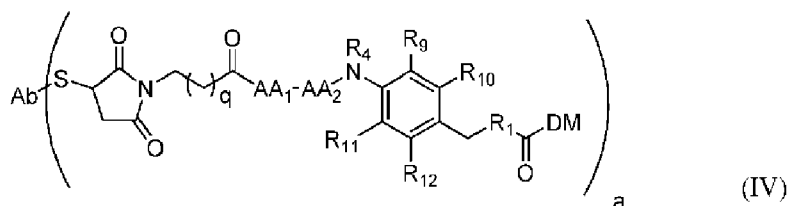
En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (III) representados por las siguientes estructuras (III)(a) y (III)(b):



en donde Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo.

5

En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (IV):



10 en donde:

Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo;

AA₁-AA₂ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

15

a es un número entero de 1 a 10;

q es 0 o un número entero de 1 a 5;

20

R₁ está ausente, es un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquínilo, un alquénilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH₂)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH₂)_{p1}-, -(CH₂)_{p1}-C(=O)-, -(CH₂)_{p1}-C(=O)-O-, -(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)-O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, en donde el alquilo, alquínilo, alquénilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

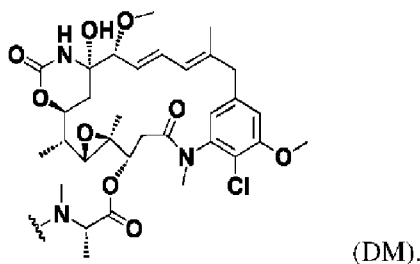
25

R₄, es H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquénilo, alquínilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

R₉, R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son cada uno independientemente H, halógeno, NR₁₃R₁₄, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R₁₅, -C(=O)-R₁₅, -C(=O)-O-R₁₅, -C(=O)-NR₁₃R₁₄, uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo; y

30

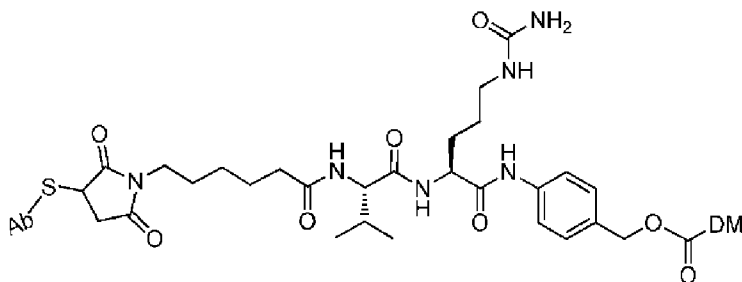
DM se representa por la siguiente estructura:



En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (IV) en donde:

- 5 q es 4; y
 R_1 se selecciona del grupo que consiste en $-O-$, $-S-$, NR_4 y $-CR_5R_6-$; y
 además, en donde R_4 , R_5 y R_6 son cada uno independientemente H o alquilo.

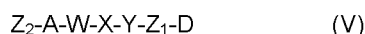
En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (IV) representados por la siguiente estructura (IV)(a):



(IV)(a),

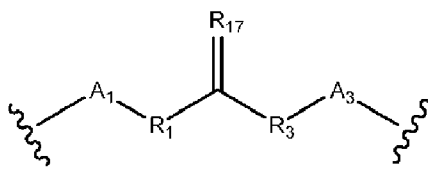
en donde Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (V)

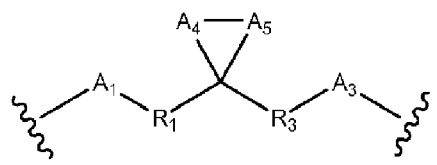


en donde:

- Z_2 y Z_1 están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;
 D es una molécula biológicamente activa;
 A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;
 W está ausente, es $-O-$, $-S-$, $-CR_5R_6-$ o $-NR_4-$;
 X está ausente, o es uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo;
 Y está ausente, es



o



en donde A_1 , A_3 , R_1 y R_3 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_2)_{p1}-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2}-)_{p3}-$, $-(CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

A_4 y A_5 son cada uno independientemente $-O-$, $-S-$, $-NR_{18}-$, $-CR_5R_6-$;

R_{17} se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR_{18} , CR_5R_6 ;

R_{18} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo;

p_1 , p_2 y p_3 son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100; y x es 0, 1 o 2.

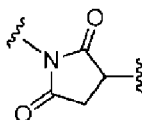
En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (V), en donde:

Z_2 se representa por la fórmula (VII):

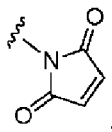


además, en donde:

Z_{2A} , Z_{2B} , Z_{2C} y Z_{2D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alqueniilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-(CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-C(=S)-N(R_4)-$, $-C(=S)-N(R_4)-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,

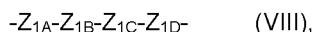


o



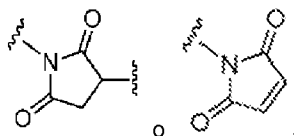
en donde el alquilo, alquinilo, alqueniilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo;

Z_1 se representa por la fórmula (VIII):



en donde:

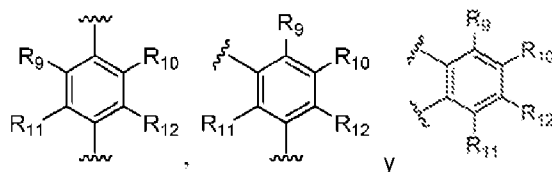
Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} y Z_{1D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alqueniilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-(CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-NR_4-$, $-N=C=S$, $-N=C=O$,



en donde el alquilo, alquinilo, alqueniilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 , R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo;

A es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina; y

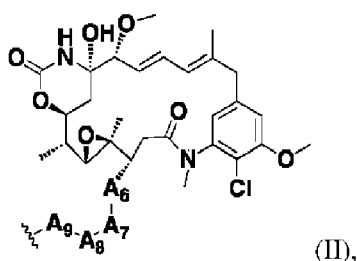
X es un arilo seleccionado del grupo que consiste en



en donde R_9 , R_{10} , R_{11} y R_{12} son cada uno independientemente H, un alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, $NR_{13}R_{14}$, nitro, ciano, $-OH$, $-O-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-R_{15}$, $-C(=O)-O-R_{15}$, $-C(=O)-NR_{13}R_{14}$,

además, en donde, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; R_{13} y R_{14} son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y R_{15} es un alquilo opcionalmente sustituido.

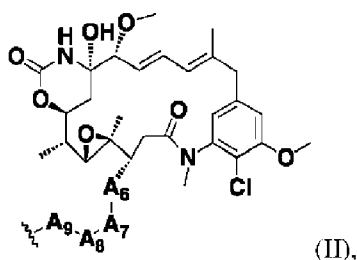
Las moléculas biológicamente activas (D) puede ser opcionalmente un maitansinoide sustituido de fórmula II:



en donde:

A_6 , A_7 , A_8 , A_9 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, aminoácido N-alquilo, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquenilo, un alquinilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_2)_{p1}-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $O-C(=O)-NR_4$, además, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos, y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo.

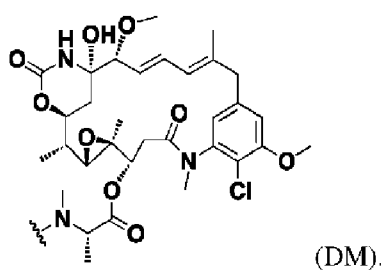
En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (V), en donde la molécula biológicamente activa es un maitansinoide opcionalmente sustituido representado por la siguiente fórmula estructural:



en donde:

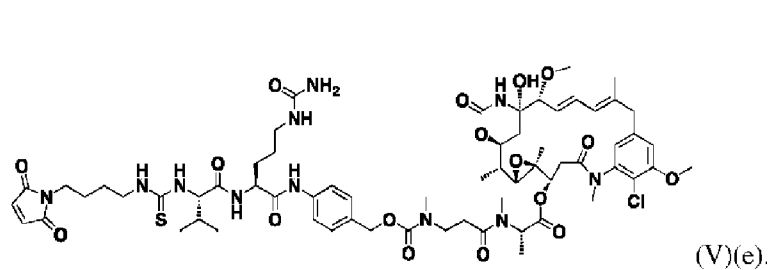
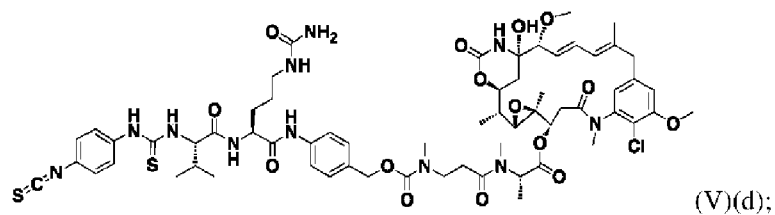
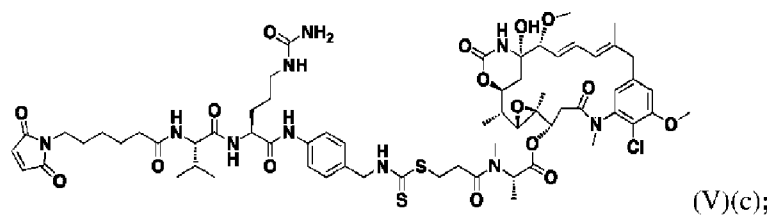
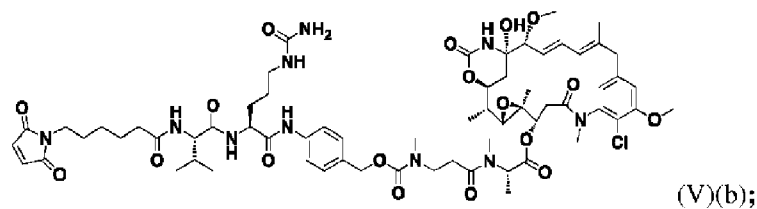
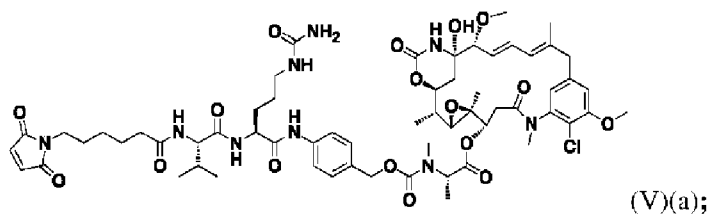
A_6 , A_7 , A_8 , A_9 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, aminoácido N-alquilo, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquenilo, un alquinilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_2)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_2)_{p1}-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_2)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $O-C(=O)-NR_4$, además, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos, y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo.

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (V), en donde la molécula biológicamente activa es un maitansinoide representado por la siguiente fórmula estructural:



En un ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (V) representados por las siguientes estructuras:

(V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d) y (V)(e):



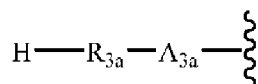
En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (IX):



en donde:

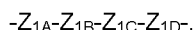
D es una molécula biológicamente activa;

Y_1 es



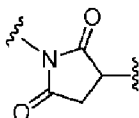
en donde R_{3a} y A_{3a} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{O}-)_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4-$, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos; y

Z_1 se representa por la siguiente fórmula estructural:

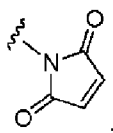


en donde:

Z_{1A} , Z_{1B} , Z_{1C} y Z_{1D} están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-(\text{CH}_2)_{p2}-\text{O}-)_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$,



o



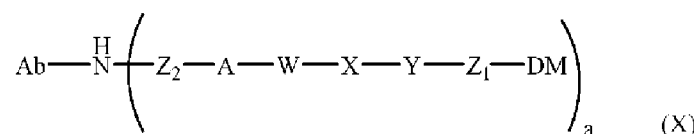
en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos y R_4 , R_5 , R_6 y R_8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuesto de fórmula (IX), en donde la molécula biológicamente activa es un macrólido biológicamente activo citotóxico. En otro ejemplo más, la divulgación proporciona compuesto de fórmula (IX), en donde el macrólido biológicamente activo es un maitansinoide. En un ejemplo adicional, la divulgación proporciona compuesto de fórmula (IX), en donde el maitansinoide se representa por la fórmula (II). En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuesto de fórmula (IX), en donde el maitansinoide se representa por la fórmula (II)(a).

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (IX), en donde la Cl_{50} del compuesto es superior a aproximadamente 10 nM.

En un ejemplo, la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (IX), en donde el compuesto es aproximadamente 10 veces menos citotóxico que el compuesto correspondiente de fórmula (I).

En otro ejemplo, la divulgación proporciona compuestos de fórmula (X):



en donde:

Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo;

a es un número entero de 1 a 10;

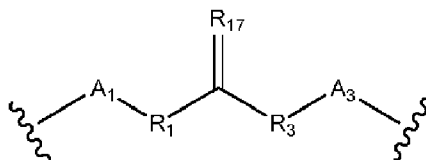
Z₂ y Z₁ están cada uno independientemente ausentes o son un espaciador;

A es un aminoácido natural o no natural, o un péptido que comprende 2-20 aminoácidos;

W está ausente, es -O-, -S-, -CR₅R₆-, -NR₄-;

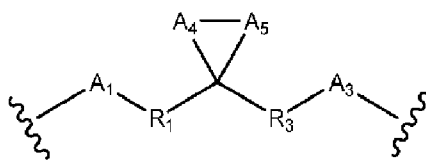
5 X está ausente, es arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterociclilo, en donde el arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

Y está ausente, es



10

o



15 en donde A₁, A₃, R₁ y R₃ están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR₅R₆-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CH_x)_{p1}-, -C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-, -(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-, -O-(CH₂)_{p2}-(CH₂)_{p3}-, -((CH₂)_{p2}-O)_{p3}-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR₄-, -N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-, -N(R₄)-C(=O)O-, -N(R₄)-C(=O)-, -C(=O)-N(R₄)-, -C(=O)-N(R₄)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR₄-, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

20 A₄ y A₅ son cada uno independientemente -O-, -S-, -NR₁₈-, -CR₅R₆-;

R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈, CR₅R₆;

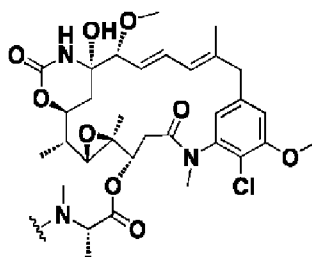
25 R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo y acilo están opcionalmente sustituidos;

R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo;

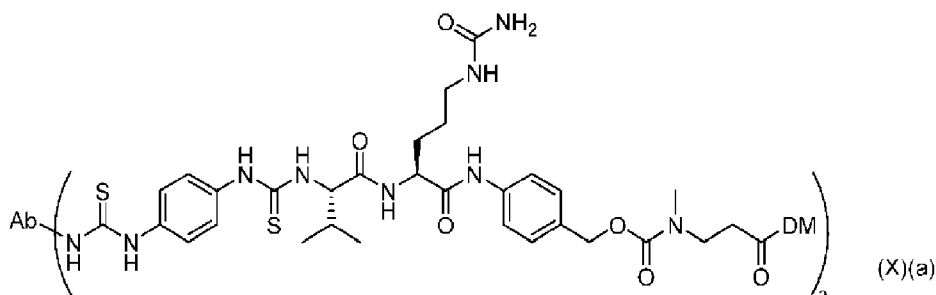
30 p₁, p₂ y p₃ son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100;

x es 0, 1 o 2; y

DM se representa por la siguiente estructura:

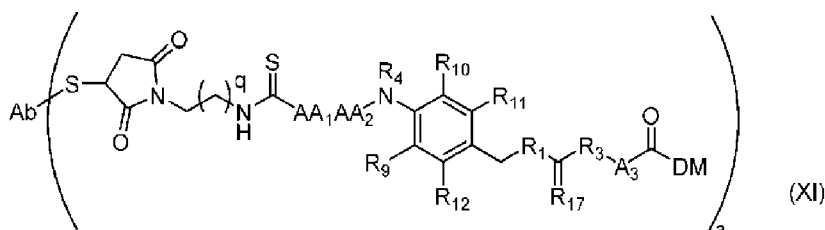


35 En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (X) representado por la siguiente estructura (X)(a):



en donde a es un número entero de 1 a 10.

En otro ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (XI):



en donde:

Ab es un anticuerpo, o un fragmento del mismo;

AA1-AA2 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina, asparagina-alanina;

a es un número entero de 1 a 10;

q es 0 o un número entero de 1 a 5;

A3, R1 y R3 están cada uno independientemente ausentes, son un aminoácido, un péptido que tiene 2-20 aminoácidos, un alquilo, un alquinilo, un alquenilo, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un heterociclilo, -CR5R6-, -O-, -C(=O)-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -O-C(=O)-O-, -C(=O)-(CHx)p1-, -C(=O)-O-(CHx)p1-, -(CHx)p1-C(=O)-, -(CHx)p1-C(=O)-O-, -(O-(CH2)p2-)p3-, -((CH2)p2-O-)p3-, -C(=S)-, -C(=S)-S-, -C(=S)-NH-, -S-C(=S)-, -S-C(=S)-S-, -S-, -SO-, -SO2-, -NR4-, -N(R4)-C(=O)-N(R8)-, -N(R4)-C(=O)O-, -N(R4)-C(=O)-, -C(=O)-N(R4)-, -C(=O)-N(R4)-C(=O)-, -O-C(=O)-NR4-, en donde el alquilo, alquinilo, alquenilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo están opcionalmente sustituidos;

R17 se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR18, CR5R6;

R4, R5, R6 y R8 son cada uno independientemente H, o uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

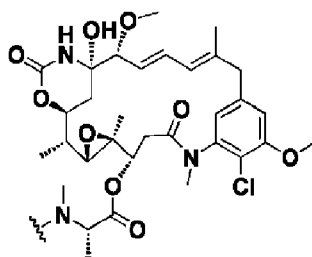
R9, R10, R11 y R12 son cada uno independientemente H, halógeno, NR13R14, nitro, ciano, -OH, -O-C(=O)-R15, -C(=O)-R15, -C(=O)-O-R15, -C(=O)-NR13R14, uno de los siguientes sustituido o sin sustituir: alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo;

R13 y R14 son cada uno independientemente H o un alquilo opcionalmente sustituido; y R15 es un alquilo opcionalmente sustituido;

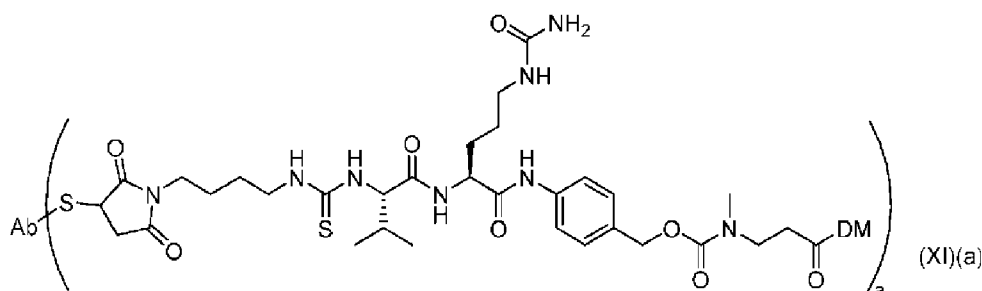
p1, p2 y p3 son cada uno independientemente 0, o un número entero de 1 a 100;

x es 0, 1 o 2; y

DM se representa por la siguiente estructura:



En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (XI) representado por la siguiente estructura (XI)(a):



en donde a es un número entero de 1 a 10.

En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V) y (X), en donde A es un péptido escindible por una proteasa.

En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (XI), en donde el péptido es escindible por una proteasa.

En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V) y (X), en donde A es un péptido escindible por una proteasa expresada en tejido tumoral.

En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (XI) en donde el péptido es escindible por una proteasa expresada en tejido tumoral.

En un ejemplo, la divulgación proporciona los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (X), en donde A es un péptido escindible por una proteasa, además, en donde la proteasa es una catepsina o una plasmina.

En un ejemplo, la divulgación proporciona el compuesto de fórmula (XI), en donde el péptido es escindible por una proteasa, además, en donde la proteasa es una catepsina o una plasmina.

Composiciones

Las composiciones que comprenden compuestos conjugados que no están incluidos por las reivindicaciones son solamente para fines de referencia.

Los ejemplos del presente documento incluyen composiciones que comprenden compuestos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (V), (X) o (XI), así como mezclas de los mismos. En algunos ejemplos, el compuesto se representa además por un compuesto de fórmula (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), (V)(e), (X)(a) o (XI)(a).

Los ejemplos del presente documento incluyen composiciones que comprenden compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) o (XI), así como mezclas de los mismos.

Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas que incluyen además uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica es la sal farmacéuticamente aceptable de compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) o (XI) o mezclas de los mismos. En algunos otros ejemplos, la composición farmacéutica es la sal farmacéuticamente aceptable de compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) o (XI) o mezclas de los mismos.

Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados se conocen bien en la técnica y se pueden determinar por un experto en la técnica según lo requiera la situación clínica. Los ejemplos de portadores, diluyentes y excipientes adecuados incluyen: tampones para el mantenimiento del pH adecuado de la composición (por ejemplo, tampones citrato, tampones acetato, tampones fosfato, tampones lactato, tampones de oxalato y similares), proteínas transportadoras (por ejemplo, seroalbúmina humana), solución salina, polioles (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, xilitol, sorbitol y similares), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, polioxolato y similares), antimicrobianos y antioxidantes.

Si así se desea, las composiciones farmacéuticas del presente documento pueden incluir un segundo o más agentes terapéuticos (por ejemplo, un adyuvante para los compuestos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI), agentes antitumorales, antibióticos, antiinflamatorios y similares). El segundo agente terapéutico se puede incluir en la misma composición que los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI), o se puede administrar por separado de los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI) (por tiempo, tipo y lugar de administración).

Un experto en la técnica de las moléculas biológicamente activas entenderá que cada uno de los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI) puede modificarse de tal manera que el compuesto resultante aún conserve una especificidad y/o actividad similares al compuesto de partida. En este sentido, la molécula biológicamente activa (D) de los compuestos de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI) puede incluir cualquiera y todos los análogos y derivados de las moléculas biológicamente activas. En un ejemplo, la molécula biológicamente activa es un macrólido y, además, es maitansina o un análogo de maitansina, como se describe en Widdison *et al.*, J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408.

En un ejemplo, la divulgación proporciona la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X), (XI), incluyendo (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (X)(a) y (XI)(a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un ejemplo, la divulgación proporciona la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente

eficaz de un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X), (XI), incluyendo (III)(a), (III)(b), (IV)(a), (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d), y (V)(e), (X)(a) y (XI)(a), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En otro ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (V), incluyendo (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d) y (V)(e), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En otro ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (IX), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 En otro ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (V) y (IX), incluyendo (V)(a), (V)(b), (V)(c), (V)(d) y (V)(e), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Método de uso

20 Las referencias a métodos de tratamiento en la siguiente sección de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Los compuestos conjugados que no están incluidos por las reivindicaciones son solamente para fines referencia.

25 Como se ha descrito anteriormente, los compuestos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X) y (XI) se pueden producir con diversos grupos funcionales de manera que la unión del ligando (L) al enlazador y, por lo tanto, una molécula biológicamente activa, forme un conjugado covalente. El ligando dirige especialmente el compuesto conjugado al compañero de unión a ligando, típicamente un polipéptido u otro antígeno similar. En un ejemplo típico, el conjugado
30 está diseñado para incluir un ligando que tenga un compañero de unión que se encuentre en células que experimentan un crecimiento celular anómalo o células implicadas en un trastorno proliferativo. Sorprendentemente, los compuestos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X) y (XI) se han diseñado de manera que el enlazador de cada compuesto se catabolice dentro de la célula unida por el conjugado. Como tal, el suministro de una molécula biológicamente activa a través de los ejemplos de conjugados del presente documento permite el suministro de moléculas biológicamente
35 activas que normalmente serían demasiado tóxicas para administrarlas de manera convencional. Los ejemplos del presente documento permiten el suministro altamente selectivo y específico de estas moléculas a células que experimentan un crecimiento celular anómalo o células implicadas en trastornos proliferativos (en comparación con el catabolismo fuera de la célula, liberando así el compuesto biológicamente activo en la sangre o el sistema linfático, por ejemplo).

40 Como puede preverse por un experto en la técnica, los compuestos conjugados covalentes descritos en el presente documento también pueden usarse para suministrar cualquier tipo de molécula biológicamente activa útil y se pueden dirigir selectivamente a cualquier tipo de población celular, por ejemplo, el conjugado puede usarse para suministrar fármacos antiproliferativos a células que experimentan un crecimiento anómalo o fármacos antivíricos a células
45 infectadas con un virus, siempre que el ligando seleccionado reconozca un compañero de unión celular adecuado.

En este sentido, se proporcionan métodos de uso para los ejemplos de compuestos conjugados descritos en el presente documento.

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento son útiles para inhibir, retrasar y/o prevenir el crecimiento celular anómalo o en el tratamiento de diversos trastornos proliferativos o patologías en mamíferos. En ejemplos típicos, el mamífero es un ser humano (los ejemplos del presente documento se describirán en relación con seres humanos). Otros mamíferos incluyen cualquier mamífero que pueda padecer un trastorno proliferativo detectable, incluyendo primates, perros, gatos, caballos, cabras, ovejas, ganado bovino, camellos y similares. Además,
55 se entiende que los compuestos conjugados de las composiciones farmacéuticas están diseñados para dirigirse selectivamente a las células que experimentan un crecimiento celular anómalo o para el tratamiento de los diversos trastornos proliferativos o patologías que se describen en el presente documento.

60 Como tal, los ejemplos del presente documento incluyen métodos para inhibir el crecimiento celular anómalo o el tratamiento de un trastorno proliferativo en un ser humano que comprende administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial. Las composiciones
65 farmacéuticas del presente documento también pueden administrarse directamente a un sitio de crecimiento celular

- anómalo (por contacto directa o indirectamente con el crecimiento celular anómalo) mediante, por ejemplo, suministro biolístico (suministro biolístico de las composiciones farmacéuticas del presente documento a un tumor de pulmón o cerebro, por ejemplo). Las pautas posológicas para la administración de las composiciones farmacéuticas del presente documento se determinarán por el profesional de la salud que atienda al paciente u otra persona experta en la técnica, así como en función de la situación clínica particular. Como es bien sabido en las técnicas farmacéuticas, las dosis para cualquier ser humano, es decir, paciente, dependen de una serie de factores, incluyendo el peso del paciente, la superficie corporal del paciente, la edad y la salud general del paciente, el sexo del paciente, el momento y la vía de administración, y la presencia de un segundo agente terapéutico. En algunos casos, los compuestos conjugados de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) pueden estar presentes en cantidades entre 1 µg y 100 mg/kg de peso corporal por dosis (cabe apreciar que cuando se considera la infusión continua como vía de administración, puede considerarse una cantidad tan pequeña como 1 pg/kg de peso corporal por minuto). Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar una o más veces al día y durante un período de días, semanas, meses o años.
- El tratamiento de un trastorno o enfermedad proliferativa, por ejemplo, un tumor, incluye métodos para reducir el tamaño de un tumor, provocar necrosis o apoptosis en un tumor, destruir un tumor, detener el aumento de tamaño de un tumor y/o prevenir la invasividad o metástasis de un tumor.
- Los ejemplos de afecciones médicas que se pueden tratar de acuerdo con métodos para inhibir el crecimiento celular anómalo o tratar trastornos proliferativos incluyen: neoplasias malignas de cualquier tipo, por ejemplo, cáncer de pulmón, colon, próstata, riñón, páncreas, hígado, ovario, piel, linfoma, leucemia y similares; enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, lupus sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple; infecciones víricas, por ejemplo, infección por CMV, infección por VIH, SIDA, hepatitis, infección por VPH; dolor; trastornos mentales; y enfermedades inflamatorias.
- Como se ha señalado anteriormente, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también son útiles en la prevención o el tratamiento de infecciones víricas, dolor, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y similares en un mamífero.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método para reducir, retrasar o detener un crecimiento celular anómalo que comprende poner en contacto la célula anómala con un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) en una cantidad suficiente para retrasar, reducir o detener el crecimiento celular anómalo, y en donde el crecimiento celular anómalo se retrasa, se reduce o se detiene.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método para destruir una célula, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) en una cantidad suficiente para destruir la célula, y en donde la célula se destruye.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método para destruir una célula, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) en una cantidad suficiente para destruir la célula, y en donde la célula se destruye y, además, en donde la célula es una célula tumoral.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno médico en un individuo que padece el trastorno médico, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI).
- En otro ejemplo distinto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno médico en un individuo que padece el trastorno médico, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI).
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno médico en un individuo que padece el trastorno médico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) y que comprende además administrar secuencial o consecutivamente una terapia adicional.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona métodos, en donde la terapia adicional es radioterapia, quimioterapia o una combinación de ambas.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno médico en un individuo que padece el trastorno médico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) y que comprende además administrar secuencial o consecutivamente una terapia adicional y administrar al menos un agente terapéutico adicional.
- En un ejemplo, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno médico en un individuo que padece el trastorno médico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), (III), (IV), (X) y/o (XI) y que comprende además administrar secuencial o consecutivamente una terapia adicional o administrar al menos un agente terapéutico adicional.

En un ejemplo, el trastorno médico tratado se selecciona de tumores, cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos óseos y vasculopatías.

Los ejemplos del presente documento también proporcionan métodos para preparar compuestos de fórmula (I) a partir de compuestos precursores o de componentes básicos de fórmula (V). En algunos ejemplos, los compuestos de fórmula (V) también se pueden usar en aplicaciones terapéuticas donde el compuesto de fórmula (V) es una composición farmacéutica. En algunos ejemplos, los compuestos de fórmula (V) se pueden incluir en cualquiera de las composiciones o composiciones farmacéuticas del compuesto (I), (III), (IV), (IX), (X) y/o (XI).

Finalmente, los ejemplos del presente documento pueden incluir mezclas de compuestos como se representa por la fórmula (I), (III), (IV), (V), (IX), (X) y/o (XI).

Producción de conjugados

Los compuestos conjugados de ligando-molécula biológicamente activa se pueden generar mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. Los compuestos conjugados de ligando-molécula biológicamente activa comprenden una unidad de ligando, una molécula biológicamente activa y, opcionalmente, un enlazador que une la molécula biológicamente activa y el ligando. La unión covalente de las moléculas biológicamente activas y/o los enlazadores al ligando se puede lograr usando una diversidad de reacciones que usan los residuos de aminoácidos del ligando, por ejemplo, anticuerpo, incluyendo los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos.

Además, los conjugados de acuerdo con diversos ejemplos descritos en el presente documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica. En los ejemplos a continuación se proporciona un protocolo ilustrativo para producir conjugados. Sin embargo, se pueden usar otros métodos conocidos, incluyendo, por ejemplo, los protocolos descritos en el documento WO 2009/134977, la Patente de EE. UU. N.º 7.811.572 y la Patente de EE. UU. N.º 6.441.163, siempre que los protocolos se usen para preparar los compuestos como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, los conjugados se pueden preparar i) haciendo reaccionar un ligando con un enlazador para formar un compuesto de ligando-enlazador modificado; ii) purificando opcionalmente el compuesto de ligando-enlazador; iii) conjugando una molécula biológicamente activa, por ejemplo, un macrólido, con el ligando-enlazador para formar un conjugado de fórmula (I), (III), (IV), (X) o (XI); y iv) purificando el conjugado.

En un ejemplo alternativo, los conjugados se pueden preparar haciendo reaccionar una molécula biológicamente activa con un primer componente del enlazador (Z_1), seguido de reacciones sucesivas para construir el enlazador, incluyendo la adición de Y, X, W, A y Z_2 , o cualquier combinación de los mismos.

En un ejemplo alternativo, los conjugados se preparan haciendo reaccionar un ligando, un enlazador y un macrólido biológicamente activo en una única reacción. Una vez preparados los conjugados de acuerdo con la invención, estos se pueden purificar.

Identificación de la citotoxicidad de los compuestos conjugados

En un ejemplo, los compuestos conjugados descritos en el presente documento se pueden evaluar para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de varias líneas de células cancerosas *in vitro*. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica (véase Widdison *et al.*, J. Med. Chem., 2006, 49(14), 4392-408) y como se ilustra en el Ejemplo de referencia 7 en el presente documento. Por ejemplo, los compuestos conjugados se pueden aplicar a células cancerosas cultivadas en placas *in vitro* durante un número predeterminado de días y las células supervivientes se pueden medir en ensayos mediante métodos conocidos. Se pueden utilizar los controles adecuados para garantizar la validez de los resultados, al igual que los valores de CI_{50} . En las figuras 1 y 2 se pueden ver ejemplos de potencia *in vitro* de los compuestos conjugados en el presente documento. Se puede usar una eficacia *in vivo* adicional para confirmar la potencia propuesta de los compuestos conjugados, por ejemplo, usando un modelo de ratón atímico.

Ejemplos

Detalles experimentales

Los espectros de RMN de protón (para compuestos que no pudieron detectarse mediante UV) se adquirieron en un instrumento Varian Inova de 300 MHz, mientras que los espectros de masas se recogieron en un dispositivo LC/MSD de la serie 1100 de Agilent con fuente de ionización por electronebulización y analizador de trampa de iones triple cuadrupolo. Los conjugados apropiados se analizaron usando un espectrómetro de masas Bruker ultraFlex Xtreme MALDI-TOF-TOF. Todos los materiales de partida y disolventes se adquirieron en el mercado y se usaron sin purificación, a menos que se indicara de otro modo.

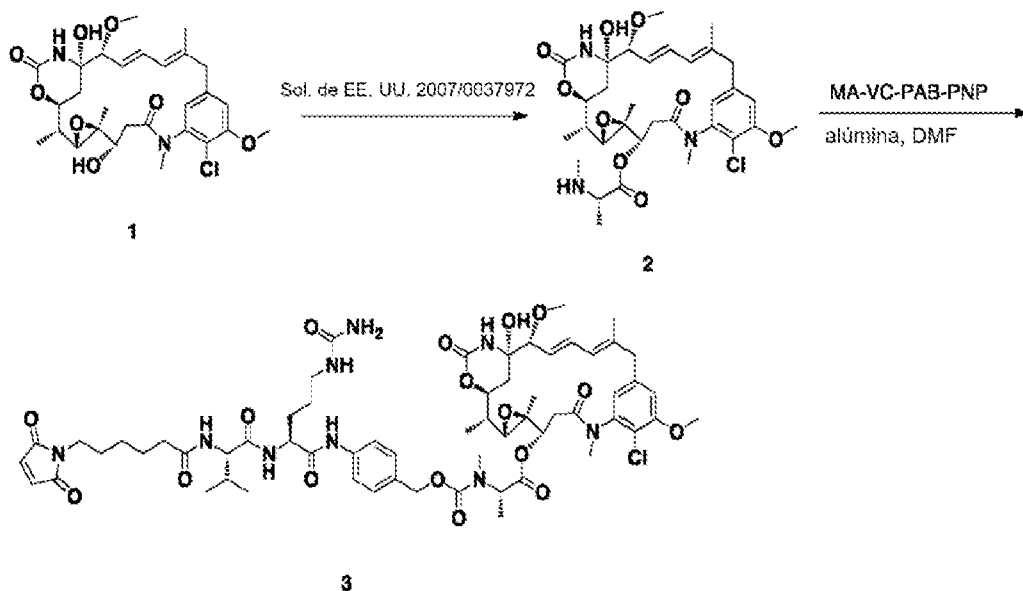
EJEMPLO 1

Etapa 1: Maitansin-3-N-metil-L-alanina (2)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color dorado a partir de maitansinol (**1**) usando los métodos descritos en la Solicitud de Patente de EE. UU. 2007/0037972 A1. MS (ESI, pos.): calc. para $C_{32}H_{44}ClN_3O_9$, 649,3; encontrado 650,6 (M+H).

Etapa 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)bencil]carbamato (**3**):

El producto de la etapa anterior (**2**, 0,020 g, 0,031 mmol) y p-NO₂-Ph-carbonato-Bn-Cit-Val-maleimida (MA-VC-PAB-PNP, 0,027 g, 0,037 mmol; Concortis Biosystems) se disolvieron en N,N-dimetilformamida (DMF, aprox. 0,25 ml) en un vial cónico, se trataron con alúmina básica Brockmann I (0,10 g), el vial se purgó con argón, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. A continuación, la mezcla se filtró, los sólidos se lavaron con acetonitrilo/agua, y el filtrado se purificó directamente en una columna 5 u, 30 x 150 mm Phenomenex Gemini C18 por HPLC (acetonitrilo al 30-90 % en agua, TFA al 0,1 % en ambos, durante 25 min, 15 ml/min). La liofilización de las fracciones más puras durante una noche dio el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,021 g, 55 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{61}H_{82}ClN_9O_{17}$, 1247,6; encontrado 1248,8 (M+H), 1270,7 (M+Na), 1231,5 (M-H₂O+H).



EJEMPLO 2

Etapa 1: Éster succinato de N-terc-butoxicarbonil-beta-alanina (**4**)

El compuesto del título se preparó a partir de Boc-β-alanina comercial mediante un método bien conocido en la técnica (véase, Widdison *et al.*, J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 3,62 (m a, 2H), 2,88 (m, 9H), 1,47 (s, 9H).

Etapa 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-Boc-β-Ala (**5**)

El producto de la etapa anterior (**4**, 0,45 g, 1,51 mmol) y maitansin-3-N-metil-L-alanina (**2**, 0,30 g, 0,23 mmol) se disolvieron en 3:1 de acetonitrilo: agua (8 ml), se trataron con NaHCO₃ acuoso 1 M (0,5 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 18 h. Cuando la reacción se completó por TLC, a continuación se extrajo con salmuera durante 10 min y se extrajo tres veces con acetato de etilo (EtOAc). A continuación, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró y se secó al vacío para dar un jarabe de color dorado que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en un cartucho de gel de sílice de 20 g (MeOH al 0-10 % en EtOAc durante 15 min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,084 g, 43 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{41}H_{59}ClN_4O_{12}$, 834,4; encontrado 835,2 (M+H), 857,2 (M+Na), 817,4 (M-H₂O+H).

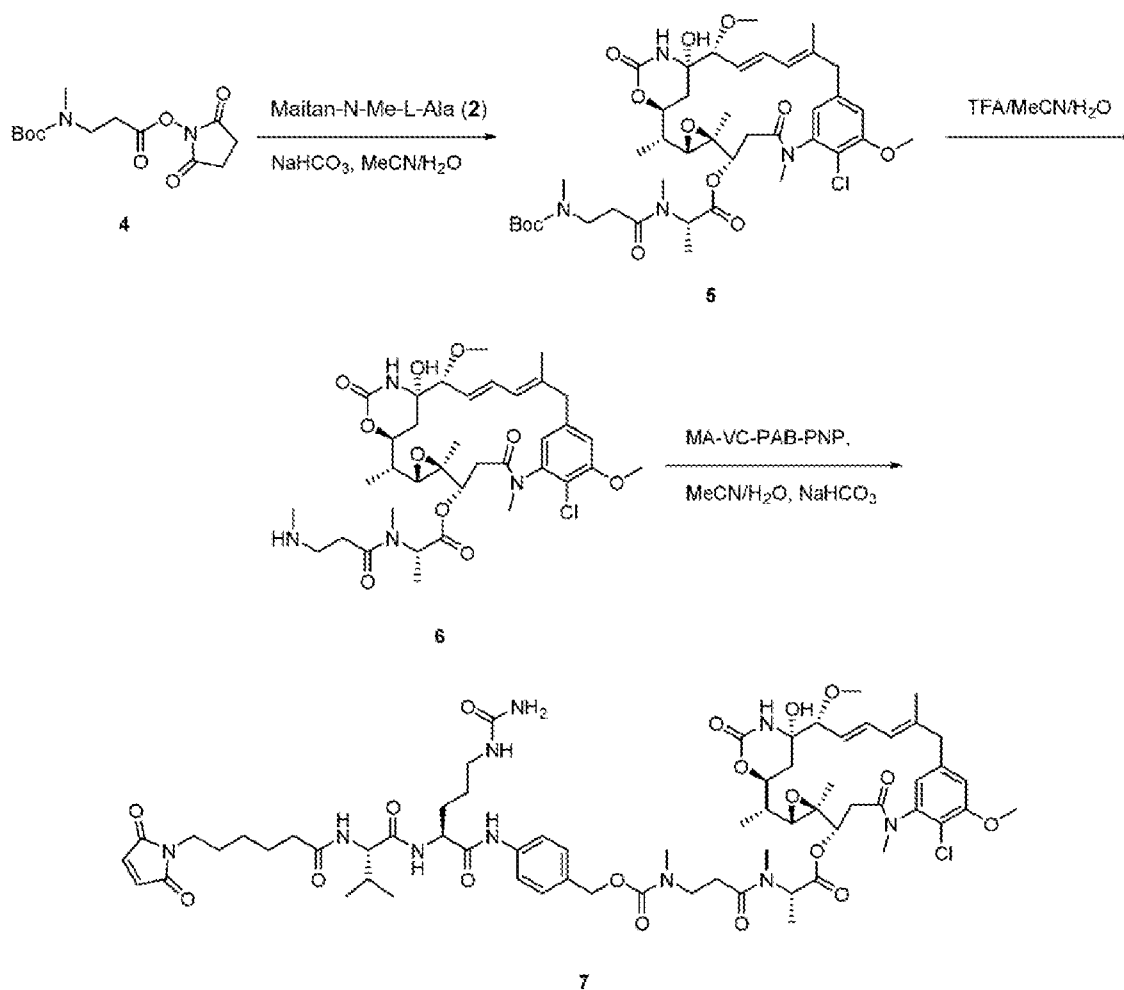
Etapa 3: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-β-Ala (**6**)

El producto de la etapa anterior (**5**, 0,080 g, 0,095 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1:1 de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético (4 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 26 horas. La mezcla de reacción en bruto se inyectó directamente en una columna de gel de sílice de 40 g C18 y se eluyó a través de ISCO CombiFlash (acetonitrilo al 10-

90 % en agua, TFA al 0,1 % en cada disolvente, durante 18 min, 40 ml/min), y las fracciones puras combinadas se liofilizaron para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,025 g, 31 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{36}H_{51}ClN_4O_{10}$, 734,3; encontrado 735,5 (M+H).

5 **Etapa 4: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-metil-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)bencil]carbamato (7)**

El producto de la etapa anterior (6, 0,014 g, 0,019 mmol) y MA-VC-PAB-PNP (0,020 g, 0,027 mmol; Concoctis Biosystems) se disolvieron en 4:1 de acetonitrilo/agua (2,5 ml), se trataron con $NaHCO_3$ acuoso 0,1 M (0,5 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa sobre sílice C18 (usando TFA al 0,1 % en gradientes de acetonitrilo/agua). La liofilización de las fracciones de columna finales dio el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,002 g, 8 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{65}H_{89}ClN_{10}O_{18}$, 1332,6; encontrado 1333,9 (M+H), 1316,5 (M-H₂O+H), 1355,9 (M+Na).



EJEMPLO 3

Etapa 1: Éster succinato de ácido 3-metilditio-propiónico (8)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco a partir de ácido 3-mercaptopropiónico usando los métodos de Widdison *et al.* J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4392-4408. 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3,09 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,86 (s, 4H), 2,44 (s, 3H).

Etapa 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-metildisulfuro (9)

El producto de la etapa anterior (8, 2,96 g, 11,9 mmol) y maitansin-3-N-metil-L-alanina (2, 1,54 g, 2,37 mmol) se disolvieron en 4:1 de acetonitrilo/agua (25 ml), se trataron con $NaHCO_3$ acuoso saturado (2 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se trató con salmuera, se extrajo tres veces con EtOAc, la capa acuosa se saturó con NaCl, se extrajo de nuevo con EtOAc, y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado se concentró al vacío para dar un jarabe de color dorado (aprox. 4,5 g) que se

purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en un cartucho de gel de sílice de 80 g (EtOAc al 0-100 % en hexanos durante 30 min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (1,14 g, 61 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{36}H_{50}ClN_3O_{10}S_2$, 783,3; encontrado 784,3 (M+H), 766,6 (M-H₂O+H).

5 *Etapas 3: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamida-3-tiol (10)*

El compuesto del título se preparó usando una versión modificada del método descrito por Whitesides *et al.* (J. Org. Chem., 1991, 56, 2648-2650). El producto de la etapa anterior (**9**, 2,42 g, 3,09 mmol) se disolvió en acetonitrilo (30 ml), se trató con una solución de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (8,23 g, 28,7 mmol) en agua (30 ml), el pH se elevó a 3 con la adición de NaHCO₃ acuoso saturado (5 ml), el matraz se purgó con Ar, y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo un tapón de caucho (ventilado debido a la efervescencia). Después de 2 horas, la reacción se trató con salmuera (aprox. 100 ml), se burbujeó con Ar durante 5 min (para eliminar el metilmercaptano libre), y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo dos veces con EtOAc, se saturó con NaCl y se extrajo dos veces más con EtOAc. A continuación, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (2,24 g, 98 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{35}H_{46}ClN_3O_{10}S$, 737,3; encontrado 738,3 (M+H), 720,3 (M-H₂O+H).

Etapas 4: 4-Amino-(N-benciloxycarbonil)bencilamina (14)

Se disolvieron 4-aminobencilamina (1,00 g, 8,18 mmol) y trietilamina (1,20 ml, 8,61 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 10 ml) en una atmósfera de N₂, se enfriaron en un baño de salmuera/hielo con agitación y se trataron gota a gota durante 20 min con una solución de cloroformiato de bencilo (1,20 ml, 8,41 mmol) en THF anhidro (10 ml). Después de completarse la adición, el baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, a continuación se filtró sobre un embudo de vidrio sinterizado para eliminar los productos insolubles. Los sólidos se lavaron con EtOAc, el filtrado se evaporó al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 40 g (EtOAc al 0-100 % en hexanos, durante 20 min, 40 ml/min). La evaporación de las fracciones puras de medio rendimiento al vacío dio el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo claro (1,47 g, 70 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{15}H_{16}N_2O_2$, 256,1; encontrado 256,9 (M+H), 278,9 (M+Na).

30 *Etapas 5: Éster de succinato de ácido 6-maleimidilhexanoico (20)*

El compuesto del título se preparó en forma de una goma incolora a partir de ácido 6-aminocaproico comercial mediante un método similar al de Mamett *et al.* (J. Med. Chem., 1996, 39, 1692-1703). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,72 (s, 2H), 3,56 (t, 2H, J = 7 Hz), 2,86 (s, 4H), 2,64 (t, 2H, J = 7 Hz), 1,81 (pentet, 2H, J = 8 Hz), 1,66 (m, 2H), 1,45 (m, 2H).

Etapas 6: Boc-valina-succinato (11)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco a partir de Boc-Val-OH mediante un método bien conocido en la técnica (véase Widdison *et al.*, J. Med. Chem., 2006, 49 (14), 4401). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5,03 (d, 1H, J = 10 Hz), 4,60 (dd, 1H, J = 9 Hz, 5 Hz), 2,85 (s, 4H), 2,32 (m, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,05 (m, 6H).

45 *Etapas 7: Boc-valina-citrulina (12)*

El producto de la etapa anterior (**11**, 4,23 g, 13,5 mmol) se disolvió en acetonitrilo (70 ml), se trató con una solución de L-citrulina (3,20 g, 18,3 mmol) en agua (30 ml) y una solución saturada de NaHCO₃ (18 ml), el matraz se purgó con N₂, y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se concentró al vacío para eliminar el acetonitrilo, se lavó una vez con EtOAc para eliminar las impurezas no polares, y la capa acuosa se saturó con NaCl y se acidificó a pH 3 con HCl al 10 %. La mezcla turbia resultante se extrajo cuatro veces con isopropanol al 10 % en EtOAc, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. La concentración y el secado del filtrado al vacío dieron el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (4,53 g, 90 %). MS (ESI, neg.): calc. para $C_{16}H_{30}N_4O_6$, 374,2; encontrado 373,0 (M-H).

55 *Etapas 8: Boc-valina-citrulina-amino-4-bencilamino-N-benciloxicarbamato (15)*

El producto de la etapa anterior (**12**, 3,08 g, 8,23 mmol) se disolvió en N,N-dimetilformamida (DMF, 30 ml, secada sobre tamices moleculares), se trató con diciclohexilcarbodiimida (DCC, 2,31 g, 11,2 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (HOBt, 1,51 g, 11,2 mmol), el matraz se purgó con N₂ y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadió una solución de 4-amino-(N-benciloxycarbonil)bencilamina (**14**, 2,30 g, 8,97 mmol) en DMF (15 ml), la reacción se agitó 3 días más, se filtró sobre un embudo de vidrio sinterizado, y los sólidos se lavaron con acetato de etilo. El filtrado se lavó con 1:1 de agua/NaHCO₃ saturado (100 ml), la capa acuosa se extrajo tres veces con isopropanol al 10 %/EtOAc, y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. Durante la filtración se formó un gel insoluble que se disolvió con metanol/EtOAc. La concentración del filtrado al vacío dio un gel gomoso de color dorado que se trató con éter dietílico (50 ml), sonicación, se filtró y se secó con succión para dar un sólido de color amarillo pálido. Este se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en

una columna de gel de sílice de 330 g (metanol al 0-10 % en diclorometano, 100 ml/min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (4,07 g, 81 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{31}H_{44}N_6O_7$, 612,3; encontrado 613,4 (M+H)

5 **Etapa 9: Boc-valina-citrulina-amino-4-bencilamina (16)**

El producto de la etapa anterior (**15**, 3,04 g, 4,96 mmol) y paladio al 10 % (0) sobre carbón activado (0,286 g, 0,269 mmol) se trataron en una corriente de N_2 con metanol (50 ml) y ácido acético glacial (0,57 ml, 9,95 mmol), la reacción se burbujeó algunos minutos cada vez con N_2 y a continuación con hidrógeno, y se agitó vigorosamente en un globo de hidrógeno a temperatura y presión ambiente durante 1 hora. Cuando la reacción se completó por TLC, el globo se retiró, la suspensión se burbujeó varios minutos con N_2 y se filtró sobre Celite 521. El Celite se lavó con metanol, el filtrado se evaporó a sequedad al vacío, y el residuo se trituró una vez con éter dietílico y se secó a alto vacío, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (2,95 g, 99 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{23}H_{36}N_6O_5$, 478,3; encontrado 479,2 (M+H).

15 **Etapa 10: Boc-valina-citrulina-amino-4-bencilisotiocianato (17)**

El producto de la etapa anterior (**16**, 0,586 g, 0,979 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano seco (20 ml) y N,N-dimetilformamida seca (5 ml) en una atmósfera de N_2 , se trató con trietilamina (0,40 ml, 2,87 mmol), se enfrió en un baño de hielo y se trató gota a gota con disulfuro de carbono (0,10 ml, 1,66 mmol) durante 5 min. La reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 2 horas, se enfrió de nuevo en hielo y se trató con cloruro de p-toluenosulfonilo (0,281 g, 1,47 mmol). Después del calentamiento a temperatura ambiente y la agitación durante 18 horas, la reacción se lavó con 1:1 de agua/salmuera, se extrajo dos veces con acetato de etilo, la capa acuosa se saturó con NaCl, se extrajo dos veces más con EtOAc, y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado evaporado se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 20 g (acetronitrilo al 0-100 % en EtOAc, 35 ml/min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color dorado (0,391 g, 77 %) después de la destilación azeotrópica con diclorometano y el secado a alto vacío. MS (ESI, pos.): calc. para $C_{24}H_{36}N_6O_5S$, 520,3; encontrado 521,1 (M+H).

30 **Etapa 11: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-Boc-valina)-bencil]-ditiocarbamato (18)**

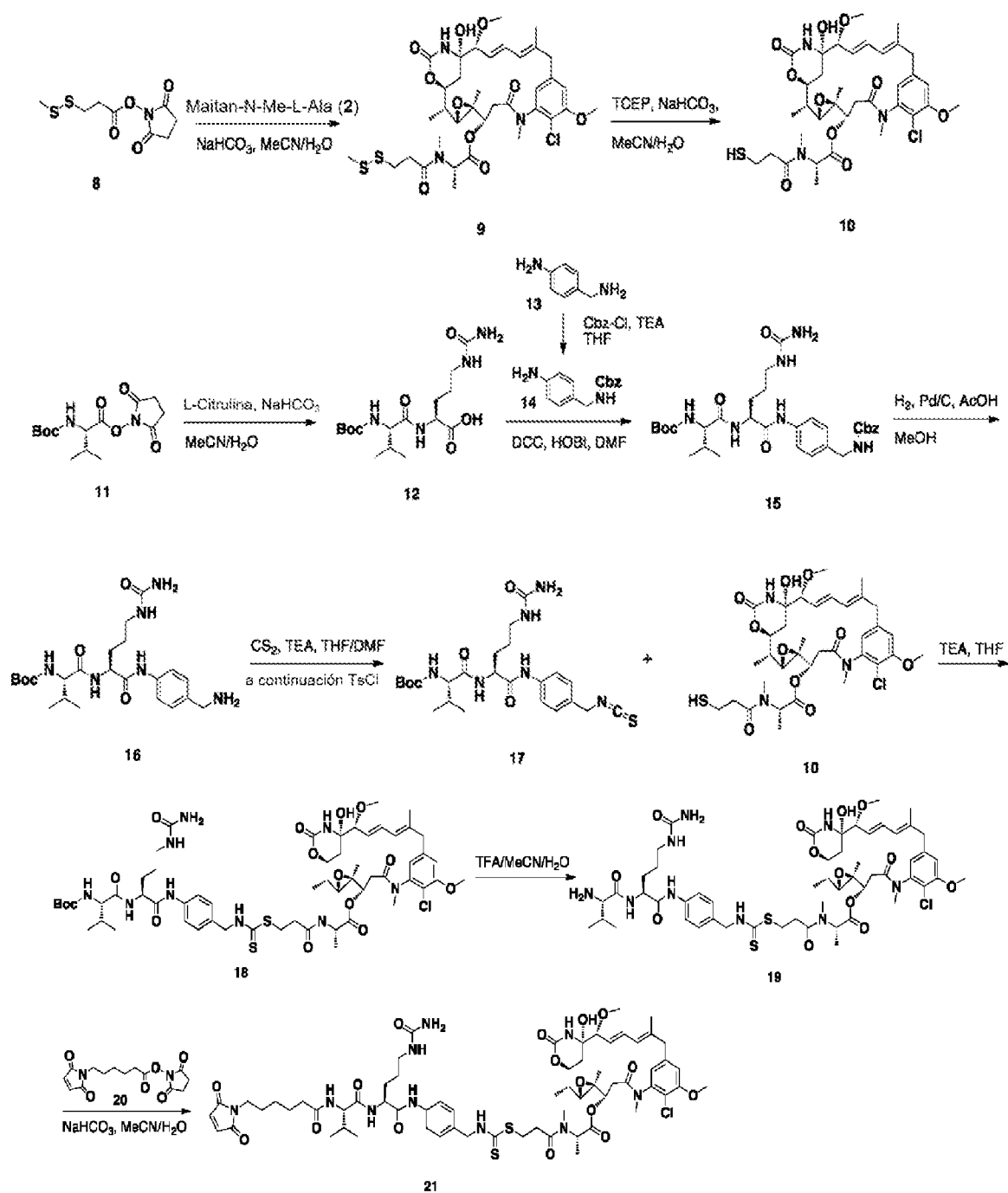
El producto de la etapa anterior (**17**, 0,068 g, 0,131 mmol) y maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamida-3-tiol (**10**, 0,048 g, 0,065 mmol) se disolvieron en THF seco (3 ml) en una atmósfera de Ar, se trataron con trietilamina (0,050 ml, 0,359 mmol) mediante una jeringa y se agitaron a temperatura ambiente bajo un tapón de caucho durante 18 horas. La reacción se concentró al vacío, se disolvió en isopropanol al 10 %/acetato de etilo y se lavó con HCl ac. 0,5 N. La capa acuosa se extrajo tres veces con IPA al 10 %/EtOAc, las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado evaporado se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 12 g (metanol al 0-20 % en EtOAc, 30 ml/min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,042 g, 51 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{59}H_{84}ClN_9O_{15}S_2$, 1257,5; encontrado 1258,8 (M+H), 1241,5 (M-H₂O+H), 1280,6 (M+Na).

Etapa 12: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-valina)-bencil]-ditiocarbamato (19)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color dorado (0,016 g, 100 %) a partir del producto de la etapa anterior (**18**, 0,014 g, 0,011 mmol) mediante el método del Ejemplo 2, Etapa 3 (compuesto **6**). El compuesto se usó sin purificación adicional. MS (ESI, pos.): calc. para $C_{54}H_{76}ClN_9O_{13}S_2$, 1157,5; encontrado 1159,4 (M+H).

50 **Etapa 13: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(amino-citrulina-valina-hexanamida-6-maleimidil)-bencil]-ditiocarbamato (27)**

El producto de la etapa anterior (**19**, 0,055 g, 0,032 mmol) se disolvió en 1:1 de acetonitrilo/agua (4 ml), se trató con $NaHCO_3$ ac. 1 N (0,5 ml) y una solución de éster succinato de ácido 6-maleimidilhexanoico (**20**, 0,070 g, 2,27 mmol) en acetonitrilo (6 ml), y el matraz se purgó con Ar bajo un tapón de caucho. Después de la agitación de la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas, se almacenó a -20 °C durante 3 días antes del calentamiento de nuevo a temperatura ambiente y la dilución con salmuera. La mezcla se extrajo tres veces con acetato de etilo, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado evaporado se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 12 g (metanol al 0-20 % en EtOAc durante 18 min, 25 ml/min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,011 g, 26 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{64}H_{87}ClN_{10}O_{16}S_2$, 1350,5; encontrado 1352,0 (M+H), 1334,5 (M-H₂O+H), 1373,5 (M+Na).



5 EJEMPLO 4

Etapas 1: Clorhidrato de N-(4-aminometil-fenil)-acetamida (23)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color amarillo claro a partir de 4-aminobencilamina mediante el método de King *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 1992, 114(8), 3033). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10,18 (s, 1H), 8,36 (s a, 3H), 7,63 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,41 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 3,95 (s, 2H), 2,06 (s, 3H).

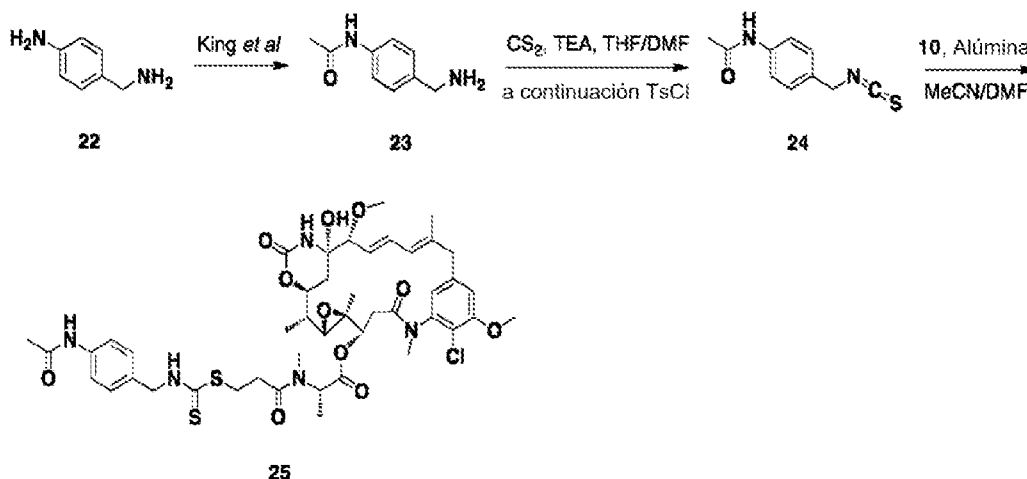
Etapas 2: N-(4-Isotiocianatometil-fenil)-acetamida (24)

El producto de la etapa anterior (23, 0,277 g, 1,38 mmol) se disolvió en THF (4,5 ml) y DMF (2,0 ml), se enfrió en hielo en una atmósfera de N_2 , se trató con trietilamina (0,66 ml, 4,73 mmol) y a continuación se trató gota a gota con disulfuro de carbono (0,125 ml, 2,07 mmol). La reacción se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 3 horas, a continuación se enfrió de nuevo en hielo. Después del tratamiento con cloruro de p-toluenosulfonilo (0,274 g, 1,45 mmol), la reacción lentamente se calentó a temperatura ambiente mientras se agitó durante 18 horas. La mezcla

se diluyó con agua, se acidificó a pH 2 con HCl ac. al 10 % y se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El filtrado evaporado se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 20 g (acetonitrilo al 0-50 % en EtOAc durante 20 min, 30 ml/min), dando el compuesto del título en forma de un sólido de color crema (0,157 g, 55 %). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,55 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz), 7,29 (m, 3H), 4,70 (s, 2H), 2,23 (s, 3H).

Etapa 3: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-propanamidil-3-N-[4-(acetamidil)bencil]-ditio-carbamato (25)

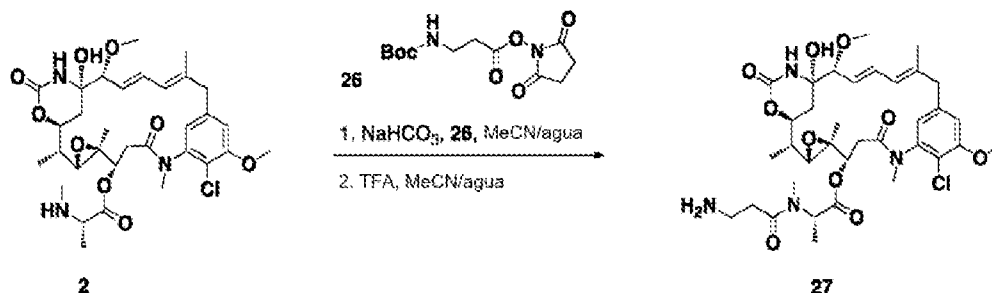
El producto de la etapa anterior (**24**, 0,093 g, 0,45 mmol) y el producto del Ejemplo 3, Etapa 3 (**10**, 0,070 g, 0,095 mmol) se disolvieron en acetonitrilo (MeCN, 2 ml) y DMF seca (1 ml) y se trataron con alúmina básica (activada, Brockmann I, 0,357 g). Después de purgar el matraz con argón, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días, se filtró, y los sólidos se lavaron con metanol/acetonitrilo. El filtrado evaporado se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 12 g (acetonitrilo al 0-50 % en EtOAc durante 15 min, 25 ml/min) y las fracciones de producto más lentas se concentraron al vacío para dar una goma impura de color amarillo pálido. Esta se purificó por RP-HPLC (columna Phenomenex Gemini C18, 30 x 150 mm, acetonitrilo al 30-90 % en agua, TFA al 0,1 % en ambos) y las fracciones puras se liofilizaron, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,016 g, 18 %). MS (ESI, pos.): calc. para $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{ClN}_5\text{O}_{11}\text{S}_2$, 943,3; encontrado 944,7 ($\text{M}+\text{H}$), 927,1 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$), 966,6 ($\text{M}+\text{Na}$).



EJEMPLO 5

Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina- β -alanina (27)

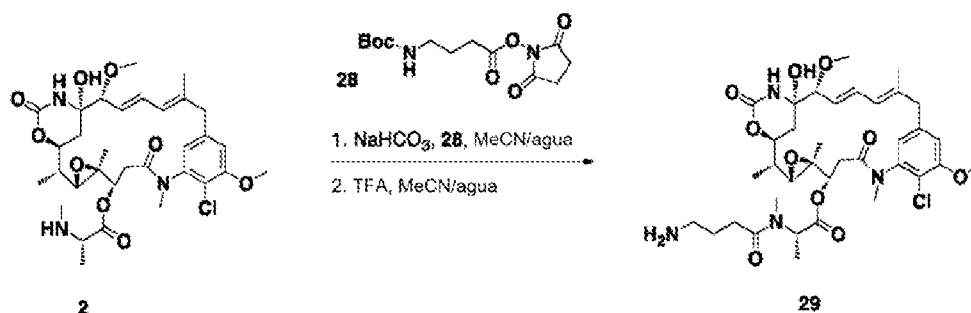
El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color amarillo pálido a partir de 3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**26**) mediante el método del Ejemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calc. para $\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{ClN}_4\text{O}_{10}$, 720,3; encontrado 721,4 ($\text{M}+\text{H}$).



EJEMPLO 6

Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina- γ -aminobutiramida (29)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color amarillo pálido a partir de N-Boc-GABA-OH (**28**) mediante el método del Ejemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calc. para $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{ClN}_4\text{O}_{10}$, 734,3; encontrado 735,5 ($\text{M}+\text{H}$).

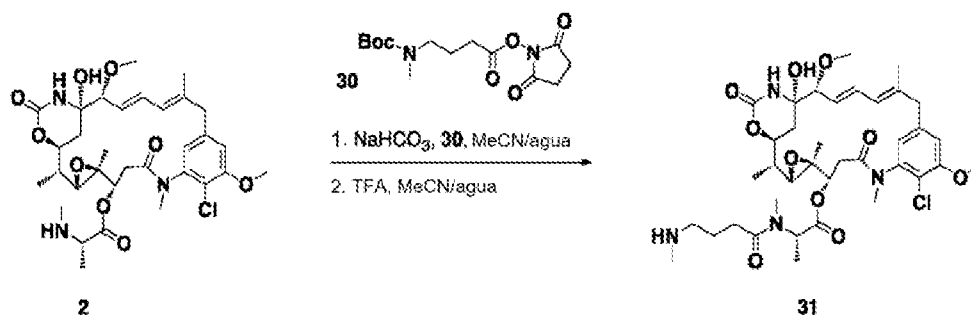


EJEMPLO DE REFERENCIA 7

5 *Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-Me-γ-aminobutiramida (31)*

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color amarillo pálido a partir N-Boc-N-Me GABA-OH (**30**) mediante el método del Ejemplo 2, Etapas 1-3. MS (ESI, pos.): calc. para C₃₇H₅₃ClN₄O₁₀, 748,4; encontrado 749,5 (M+H).

10



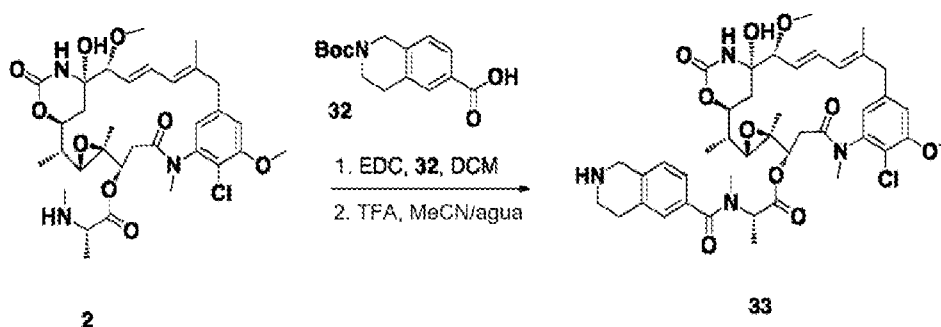
EJEMPLO 8

15 *Etapas 1: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carboxi-6-[3,4-dihidro-2-(terc-butoxicarbonil)-1H-isoquinolina]*

Se pesaron maitan-3-N-metil-L-(S)-alanina (2, 0,034 g, 0,052 mmol), ácido N-Boc-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-6-carboxílico comercial (32, 0,019 g, 0,069 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, 0,024 g, 0,125 mmol) en un matraz de fondo redondo con una barra de agitación, se disolvieron en diclorometano (3 ml), el matraz se purgó con Ar y se cerró herméticamente con un tapón de caucho, y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 días, la reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO₃ ac. diluido, y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. A continuación, el filtrado evaporado se purificó en una columna de gel de sílice de 12 g RediSep Gold mediante un sistema ISCO (EtOAc - 5:5:1 de EtOAc/DCM/MeOH durante 12 min, 30 ml/min), y las fracciones puras por TLC combinadas se evaporaron y se secaron al vacío, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color pálido (0,026 g, 55 %). MS (ESI, pos.): calc. para C₄₇H₆₁ClN₄O₁₂, 908,4; encontrado 909,2 (M+H), 891,2 (M-H₂O+H).

30 *Etapas 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carboxi-6-(1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina) (33)*

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco (0,013 g, 52 %) a partir del producto de la etapa anterior (0,025 g, 0,027 mmol) mediante el método del Ejemplo 2, Etapa 3 (compuesto **6**). MS (ESI, pos.): calc. para C₄₂H₅₃ClN₄O₁₀, 808,3; encontrado 809,2 (M+H).



35

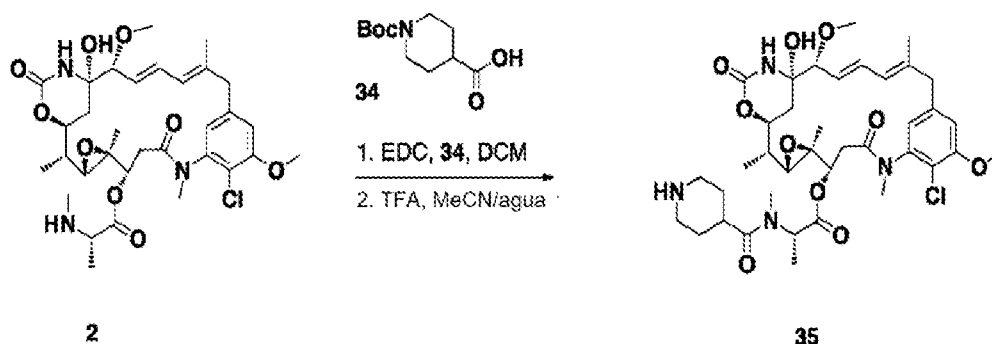
EJEMPLO 9

Etapa 1: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carboxi-4-[1-(terc-butoxicarbonil)-piperidina]

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco (0,027 g, 46 %) a partir de maitan-3-N-metil-L-(S)-alanina (**2**, 0,045 g, 0,069 mmol) y ácido 1-t-butoxicarbonilpiperidin-4-carboxílico comercial (**34**, 0,024 g, 0,105 mmol) mediante el método del Ejemplo 8, Etapa 1. MS (ESI, pos.): calc. para $C_{43}H_{61}ClN_4O_{12}$, 860,4; encontrado 861,2 (M+H), 843,2 (M-H₂O+H).

Etapa 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-carboxi-4-piperidina (35)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco (0,012 g, 50 %) a partir del producto de la etapa anterior (0,025 g, 0,029 mmol) mediante el método del Ejemplo 2, Etapa 3 (compuesto **6**). El compuesto se purificó en una columna C18 usando un gradiente y un modificador diferentes (MeCN al 20-80 % en agua, ácido acético al 0,05 % en ambos). La liofilización de las fracciones puras dio el compuesto del título (0,008 g, 35 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{38}H_{53}ClN_4O_{10}$, 760,3; encontrado 761,2 (M+H).



EJEMPLO 10

Etapa 1: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-metil-beta-alanina-N-[4-(terc-butoxicarbonil-valina-citrulina-amino)benciloxi]-carbamato

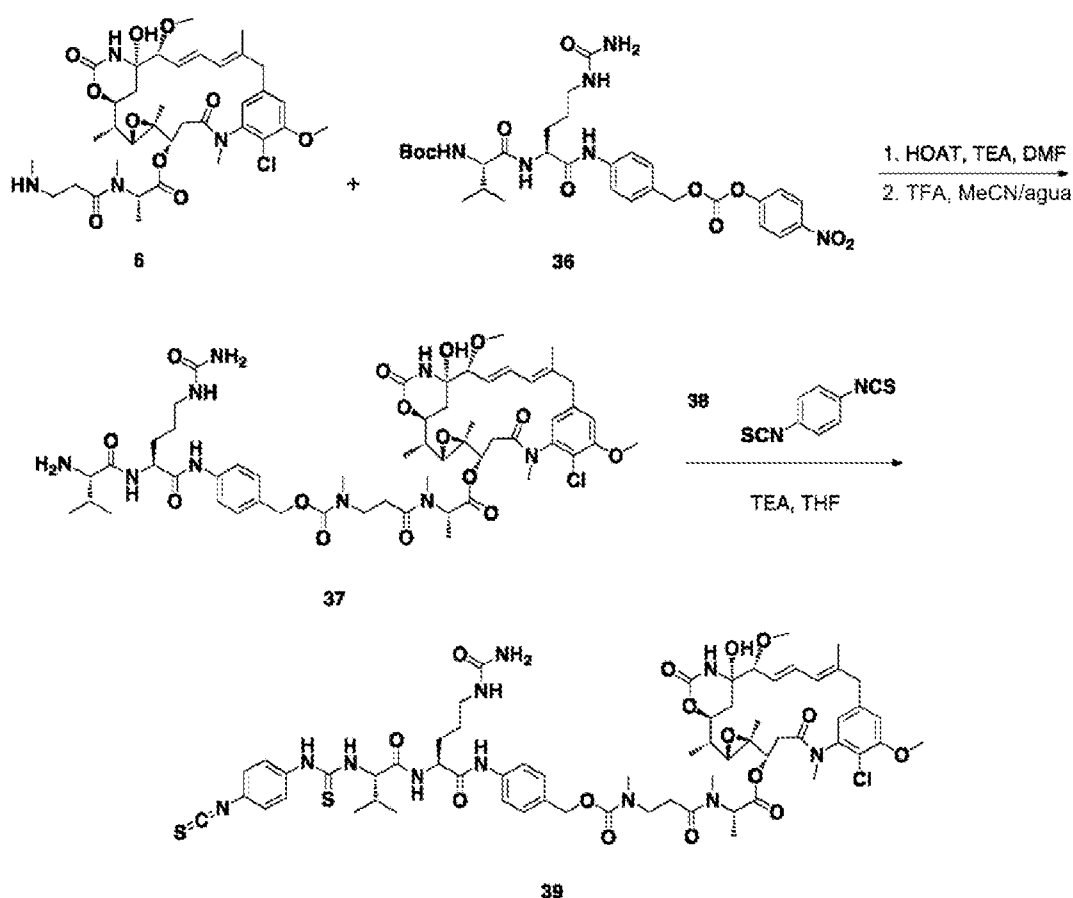
El Boc-valina-citrulina-p-aminobenciloxi-(p-nitrofeniloxi)-carbonato (**36**), preparado de acuerdo con el documento WO 2005112919, (0,092 g, 0,143 mmol), el producto del Ejemplo 2, Etapa 3 (**6**, 0,110 g, 0,130 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT, 0,037 g, 0,272 mmol) se disolvieron en DMF (7 ml), se trataron con trietilamina (0,100 ml, 0,717 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente en un matraz tapado. Después de 18 horas, la mezcla de reacción se concentró para dar un aceite al vacío, se disolvió en diclorometano y se purificó en una columna de 24 g RediSep Gold mediante ISCO Combiflash (metanol al 0-20 % en acetato de etilo). A continuación, la evaporación de las fracciones de producto al vacío dio el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,129 g, 80 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{60}H_{86}ClN_9O_{17}$, 1239,6; encontrado 1240,8 (M+H).

Etapa 2: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-metil-beta-alanina-N-[4-(valina-citrulina-amino)benciloxi]-carbamato (37)

El compuesto del título se preparó en forma de un sólido de color blanco (0,074 g, 63 %) a partir del producto de la etapa anterior (0,128 g, 0,103 mmol) mediante el método del Ejemplo 2, Etapa 3 (compuesto **6**). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{55}H_{78}ClN_9O_{15}$, 1139,5; encontrado 1141,4 (M+H).

Etapa 3: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-metil-beta-alanina-N-[4-(4-(isotiocianato-fenil)-tioureido-valina-citrulina-amino)benciloxi]-carbamato (39)

El producto de la etapa anterior (**37**, 0,037 g, 0,029 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (THF, 5 ml) en un vial, se trató con trietilamina (0,020 ml, 0,143 mmol), y la solución resultante se añadió gota a gota a un matraz que contenía una solución agitada de 1,4-fenilendiisotiocianato (**38**, 0,055 g, 0,286 mmol) en THF (10 ml) durante 15 min. El vial se aclaró con THF (2 ml) y la solución se añadió al matraz de reacción, que se cerró herméticamente con un tapón de caucho. Después de la agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, la reacción se concentró al vacío a sequedad, el producto en bruto se disolvió en acetonitrilo y se filtró sobre una membrana PTFE de 0,45 µm. A continuación, el filtrado se purificó en una columna de 30 g C18 RediSep Gold mediante ISCO (MeCN al 20-80 % en agua, HOAc al 0,05 % en ambos disolventes) y las fracciones más puras (por LC) se combinaron, se congelaron a -78 °C y se liofilizaron, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,023 g, 59 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{63}H_{82}ClN_{11}O_{15}S_2$, 1331,5; encontrado 1332,0 (M+H).



EJEMPLO 11

Etapa 1: 1-(4-Amino-butil)-maleimida

Una solución de Boc-1-aminobutil-4-maleimida comercial (0,304 g, 1,13 mmol) en diclorometano (10 ml) se trató con ácido trifluoroacético (1,00 ml, 13,1 mmol), el matraz se purgó con Ar, se cerró herméticamente con un tapón de caucho y un respiradero de burbujeo y se agitó a temperatura ambiente. La reacción se completó por TLC después de 18 horas, por lo que se concentró al vacío, se trituró dos veces con éter dietílico y se secó al vacío para dar una goma. Esta se trituró dos veces más con éter (mientras se raspaba con una espátula), se decantó y se secó de nuevo al vacío, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,321 g, 100 %). MS (ESI, pos.): calc. para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 168,1; encontrado 169,0 (M+H).

Etapa 2: 1-(4-Isotiocianato-butil)-maleimida (41)

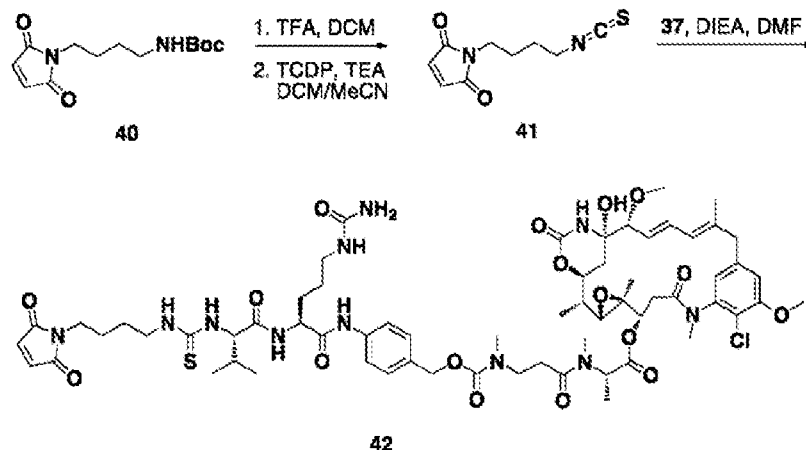
El producto de la etapa anterior se disolvió en acetonitrilo (MeCN, 3 x 40 ml) y se concentró al vacío a 60 °C mediante un evaporador rotatorio. El producto seco (0,650 g, 2,45 mmol) se disolvió en MeCN (75 ml) y cloroformo (30 ml) en un matraz, se trató con trietilamina (1,0 ml, 7,35 mmol), y la solución resultante se añadió gota a gota a un matraz que contenía 1,1'-tiocarbonildi-2,2'-piridona (0,68 g, 2,94 mmol) en cloroformo (25 ml) en una atmósfera de nitrógeno durante 10 min. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, la reacción se concentró al vacío a sequedad, el producto en bruto se disolvió en diclorometano (DCM) y se purificó en una columna de gel de sílice de 120 g RediSep Gold por cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 0-10 % en DCM). Las fracciones más limpias (por LC) se combinaron y se concentraron a sequedad, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,26 g, 50 %). MS (ESI, pos.): calc. para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 210,0; encontrado 211,2 (M+H).

Etapa 3: Maitansin-3-N-metil-L-(S)-alanina-N-metil-beta-alanina-N-[4-(4-[maleimidilbutil]-tioureido-valina-citrulina-amino)benziloil]-carbamato (42)

El producto del Ejemplo 10, Etapa 2 (37, 0,029 g, 0,023 mmol) se disolvió en DMF seca (2 ml), se trató con diisopropiletilamina (0,020 ml, 0,115 mmol) mediante una jeringa seca, a continuación con una solución de producto de la etapa anterior (41, 0,026 g, 0,124 mmol) en DMF seca (2 ml). El matraz de reacción se purgó con Ar, se cerró herméticamente con un tapón de caucho, y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 18 horas la reacción pareció haberse completado al 80 % por LCMS, por lo que se evaporó para dar un aceite al vacío, se disolvió en MeCN/agua y se purificó en una columna de 30 g C18 RediSep Gold por cromatografía en columna ultrarrápida (MeCN al 20-80 % en agua, HOAc al 0,05 % en ambos disolventes). Las fracciones más limpias por LCMS se

combinaron, se evaporaron en un evaporador rotatorio brevemente, se congelaron en hielo seco y se liofilizaron durante una noche, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,020 g, 65 %). MS (ESI, pos.): calc. para $C_{64}H_{88}N_{11}O_{17}SCl$, 1349,6; encontrado 1351,1 (M+H), 1372,9 (M+Na), 1333,6 (M-H₂O+H).

5



EJEMPLO 12

Preparación y caracterización de conjugados

10

Para el conjunto inicial de experimentos, se conjugaron cuatro anticuerpos con diversos compuestos de enlazador-fármaco de la divulgación usando el procedimiento que se indica a continuación. Los cuatro anticuerpos usados en estos experimentos fueron: (1) un anticuerpo PSMA que tiene los dominios variables de cadena pesada y ligera del clon AB-PG1-XG1-006 como se expone en el documento WO 2007002222A2, (2) un anticuerpo STEAP1 que tiene los dominios variables de cadena pesada y ligera del clon mu120, expresado como hIgG 1, como se expone en el documento WO 2008052187A2, (3) un anticuerpo EGFRvIII que tiene los dominios variables de cadena pesada y ligera del clon 131 como se expone en el documento WO2013075048A1, y (4) un PRLR que tiene los dominios variables de cadena pesada y ligera del clon H1H6953N como se expone en la Solicitud de EE. UU. N.º de Serie 61/868.185; presentada el 21 de agosto de 2013. Todos los anticuerpos monoclonales se expresaron en células CHO y se purificaron con proteína A. También se usó un control de no unión procedente de un antígeno inmunitario que no tiene relación con la oncología.

20

Método de conjugación para los compuestos 3, 7, 21 y 42

25

El anticuerpo (10 mg/ml) en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, se trató con ditioneitol 1 mM a 37 °C durante 30 min. Después de la filtración en gel (G-25, acetato de sodio a pH 4,5), el derivado de carga activa del enlazador maleimido (1,2 equivalentes/grupo SH) en DMSO (10 mg/ml) se añadió al anticuerpo reducido y la mezcla se ajustó a pH 7,0 con HEPES 1 M (pH 7,4). Después de 1 h, la reacción se interrumpió con un exceso de N-etil-maleimida. Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se filtraron en condiciones estériles. Las concentraciones de carga activa de proteína y enlazador se determinaron mediante análisis espectral UV. El análisis por HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados usados eran >95 % monoméricos, y el análisis por RP-HPLC estableció que había <0,5 % de carga activa de enlazador no conjugado. Los rendimientos se indican en la Tabla 1 basándose en la proteína. Todos los anticuerpos conjugados se analizaron mediante UV para determinar los valores de carga activa del enlazador de acuerdo con Hamblett *et al.*, Cancer Res., 2004 10 7063. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

30

35

Método de conjugación para el compuesto 39

40

Al anticuerpo (2-5 mg/ml) en carbonato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 9,0, se le añadió dimetilacetamida al 15 % en volumen. Al anticuerpo se le añadió el derivado de carga activa del enlazador 39 (5-10 equivalentes) en DMSO (10 mg/ml) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4-12 horas. Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se filtraron en condiciones estériles. Las concentraciones de carga activa de proteína y enlazador se determinaron mediante análisis espectral UV. El análisis por HPLC de exclusión por tamaño estableció que todos los conjugados usados eran >95 % monoméricos, y el análisis por RP-HPLC estableció que había <0,5 % de carga activa de enlazador no conjugado. Para estos conjugados, la relación de carga activa/anticuerpo se determinó mediante MALDI-TOF (Tabla 1).

45

| Tabla 1 | | |
|-------------------------------|---|---|
| Compuesto | $\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ | $\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ |
| 3 | 32000 | 8500 |
| 7 | 50600 | 8100 |
| (continuación) | | |
| Compuesto | $\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ | $\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ |
| 21 | 44190 | 9460 |
| 39 | -- | -- |
| | | |
| Anticuerpo | $\epsilon_{252 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ | $\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ |
| STEAP1 | 87939 | 244276 |
| AMEP | 77652 | 224320 |
| PRLR | 80673 | 220420 |
| EGFRvIII | 79579 | 209420 |
| Control de isotipo | 75113 | 218360 |
| | | |
| Conjugado de anticuerpo | Carga activa:Anticuerpo (UV) | % de rendimiento |
| STEAP1- 7 | 1,4 | 36 |
| PSMA- 3 | 3,5 | 44 |
| PSMA- 7 | 3,4 | 60 |
| PSMA- 21 | 0,9 | 45 |
| PRLR- 7 | 3,0 | 70 |
| EGFRvIII- 7 | 3,4 | 64 |
| EGFRvIII- 39 | 1,3 (MALDI) | 40 |
| Control de isotipo- 3 | 3,0 | 48 |
| Control de isotipo- 7 | 2,3 | 51 |
| Control de isotipo- 21 | 2,3 | 45 |
| Control de isotipo- 39 | 1,1 (MALDI) | 40 |

EJEMPLO 13

5

Ensayos enzimáticos acelulares *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)Incubación de catepsina B

- 10 El procedimiento de ensayo enzimático acelular *in vitro* se adoptó de Dubowchik, *et al.*, Bioconjugate Chem. 2002 13 855. La concentración de PRLR-**7** corregido por DAR y de Control de isotipo **7** se estableció en 7,00 uM en tampón acetato de sodio 25 mM, EDTA 1 mM, a pH 5,0 y se preincubó a 37 °C. La catepsina B (Sigma n.º C8571) se activó a temperatura ambiente durante 15 minutos con 1 equivalente de DTT 30 mM, EDTA 15 mM a 2 equivalentes de solución madre de catepsina B. La solución de catepsina B activada se añadió a las soluciones de ADC en una relación molar de 1:750. Las muestras se incubaron a 37 °C durante un período de 24 horas y se dividieron en alícuotas para la detección por HPLC (HISEP)-UV o la detección por LC-MS, véase más adelante.

Detección por LC-MS

- 20 En los puntos temporales designados, una pequeña alícuota se extrajo y se combinó con 2 equivalentes en volumen de metanol frío. El sobrenadante se recuperó y se analizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) para la escisión de la carga activa del enlazador de catepsina B, lo que produjo el compuesto **6** usando una

columna Merck Chromolith FastGradient RP-18e, de 2 x 50 mm, MeCN del 10 al 90 % durante 5 min, en H₂O con HOAc al 0,05 % en ambos disolventes y un caudal de 1 ml. El perfil de elución se controló a 254 nm. Todas las alícuotas incubadas a 37 °C con catepsina B contenían el compuesto **6** que se eluyó en 5,1 minutos con una masa de 735 M+H (calc. para C₃₆H₅₁CIN₄O₁₀, 734,3) y ninguna de las alícuotas sin catepsina B contenía nada del compuesto **6**. Esto también se confirmó mediante la inyección del compuesto **6** puro del Ejemplo 2, etapa 3.

Detección por HPLC (HISEP)-UV

Las soluciones se inyectaron "tal cual" en los puntos temporales designados. Se utilizó el siguiente método de gradiente: Tampón A al 100 % de NH₄OAc 100 mM, pH 7,0 y tampón B al 100 % de acetonitrilo, caudal 0,4 ml/min, tampón B del 5 al 70 %, sobre una columna Supelco LC-HISEP; 150 mm x 4,6 mm. El perfil de elución se controló a 280 nm y 252 nm. Todas las alícuotas de los ADC incubados con catepsina B contenían una especie que eluye en 19,4 minutos. El compuesto puro **6** eluye al mismo tiempo de retención en las mismas condiciones de gradiente. La especie de 19,4 minutos no estaba presente en la alícuota sin catepsina B.

Los resultados de este Ejemplo son significativos en parte porque la proteólisis de catepsina B de **6** solo debería producirse después de la internalización del ADC en la célula donde existe la enzima. Los efectos inespecíficos deberían reducirse ya que el anticuerpo suministra la carga activa citotóxica directamente a las células diana.

EJEMPLO 14

Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

En este Ejemplo, se evaluó la capacidad de diversos conjugados de anticuerpo-fármaco para destruir células tumorales que expresan antígeno *in vitro*.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos revestidas con PDL a razón de 375 (MMT/hEGFRvIII), 1500 (U251/hEGFRvIII), 2000 (HEK293/hEGFRvIII) o 3000 (C4-2, PC3/hSTEAP1, T47D y U87-MG) células por pocillo en un medio de crecimiento completo y se cultivaron durante una noche. Para las curvas de viabilidad celular, se añadieron a las células conjugados diluidos en serie o cargas activas representativas libres a concentraciones finales que variaban de 500 nM a 1 pM y se incubaron durante 3 días. Para medir la viabilidad en MMT/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII, HEK293/hEGFRvIII, C4-2, PC3/hSTEAP1 y U87-MG, las células se incubaron con CCK8 (Dojindo) durante las últimas 1-3 horas y la absorbancia a 450 nm (DO450) se determinó en un Flexstation3 (Molecular Devices). Para medir la viabilidad en T47D, las células se incubaron en hielo durante 30 min en formaldehído al 4 % + 3 ug/ml de Hoechst. Las imágenes de los núcleos teñidos con Hoechst se adquirieron en el ImageXpress Micro XL (Molecular Devices) y los recuentos nucleares se determinaron con el software de análisis Columbus (PerkinElmer). Los niveles de fondo de DO450 (CCK8) o los recuentos nucleares de las células tratadas con digitonina (40 nM) se restaron de todos los pocillos y la viabilidad se expresa como un porcentaje de los controles no tratados. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros sobre una curva de respuesta de 10 puntos (GraphPad Prism). Todas las curvas y los valores de CI₅₀ se corrigen para los equivalentes de carga activa.

En las células C4-2 (línea de cáncer de próstata), que expresan de forma natural PSMA a razón de 271 veces por encima de la unión del control de isotipo, los conjugados de maitansinoide PSMA-3, PSMA-7 y PSMA-21 poseen valores de CI₅₀ de 3,8, 0,5 y 8,3 nM, respectivamente (figura 1). El anticuerpo PSMA desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

En las células PC3/hSTEAP1 (línea de cáncer de próstata), que expresan hSTEAP1 a razón de 352 veces por encima de la unión del control de isotipo, el conjugado de maitansinoide STEAP1-7 posee un valor de CI₅₀ de 4 nM (figura 2). El anticuerpo STEAP1 desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

En las células T47D (línea de cáncer de mama), que expresan de forma natural PRLR a razón de 14 veces por encima de la unión del control de isotipo, el conjugado de maitansinoide PRLR-7 posee un valor de CI₅₀ de 1,0 nM (figura 3). El anticuerpo T47D desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

En las células HEK293/hEGFRvIII, que expresan hEGFRvIII a razón de 360 veces por encima de la unión del control de isotipo, el conjugado de maitansinoide EGFRvIII-7 posee un valor de CI₅₀ de 0,4 nM (figura 4). El anticuerpo EGFRvIII desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

En las células MMT/hEGFRvIII, que expresan hEGFRvIII a razón de 280 veces por encima de la unión del control de isotipo, el conjugado de maitansinoide EGFRvIII-7 posee un valor de CI₅₀ de 0,3 nM (figura 5). El anticuerpo EGFRvIII desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

En las células U251/hEGFRvIII (línea de cáncer de glioblastoma), que expresan hEGFRvIII a razón de 165 veces por encima de la unión del control de isotipo, el conjugado de maitansinoide EGFRvIII-7 posee un valor de CI₅₀ de 0,3 nM (figura 6). El anticuerpo EGFRvIII desnudo carecía de cualquier actividad antiproliferativa.

También se ensayó la citotoxicidad *in vitro* de las cargas útiles liberadas propuestas ("fármacos libres") en las diversas líneas celulares descritas anteriormente y se representó gráficamente junto con los anticuerpos conjugados con fines comparativos (véanse los cuadrados de color negro (■) en las figuras 1 a 6). Para las cargas útiles de enlazador **3** y **7**, las cargas útiles liberadas propuestas **2** y **6**, respectivamente, se pueden usar en los ensayos celulares directamente ya que son estables. Sin embargo, para la carga activa de enlazador **21**, se propone que la carga activa liberada sea el compuesto sulfhidrilo **10**. Dado que **10** podría ser un compuesto muy reactivo, lo que conduciría a resultados poco fiables, se eligió el compuesto **25** para representar la carga activa liberada en estos ensayos.

En un conjunto de experimentos separado, compuesto **6**, junto con los análogos de amino **27**, **29** y **31** se ensayaron en HEK293 y U87MG para determinar la actividad antiproliferativa (figura 7). Todos estos compuestos tenían valores de $Cl_{50} > 30$ nM, lo que indica que son muy citotóxicos solo cuando se unen a un anticuerpo a través de un enlazador apropiado. (Para estos experimentos, no se realizó la corrección de fondo con digitonina).

En otro conjunto más de experimentos, se ensayaron los compuestos **6**, **9**, **33** y **35** en HEK293, U251, C4-2, PC3 y MMT para determinar la actividad antiproliferativa (figura 8). Los compuestos amino **6**, **33** y **35** tenían valores de Cl_{50} variables, como se enumera en la Tabla 2. La tendencia en la potencia sigue **9** > **33** > **35** > **6** y es consistente para las 5 líneas celulares ensayadas.

Tabla 2

| Compuesto | Cl_{50} (nM) | | | | |
|-----------|----------------|------|------|-----|-----|
| | HEK293 | U251 | C4-2 | PC3 | MMT |
| 9 | 0,2 | 0,4 | 1,5 | 0,4 | 0,3 |
| 33 | 20 | 15 | 20 | 30 | 20 |
| 35 | 50 | 25 | 55 | 65 | 60 |
| 6 | 200 | 150 | 200 | 250 | 250 |

Sin limitarse a ninguna teoría, los resultados de estos experimentos demuestran que las versiones "liberadas" o "de fármaco libre" de los compuestos de la presente divulgación (es decir, los compuestos no conjugados con un anticuerpo) fueron, en la mayoría de los casos, sustancialmente menos citotóxicos que cuando se conjugaron con un anticuerpo diana. Esta característica de la presente divulgación sugiere que los conjugados de anticuerpo-fármaco que comprenden los compuestos de la invención causarán menos efectos secundarios y menos toxicidad no deseada, ya que las propiedades de destrucción celular se concentrarán específicamente en el sitio del antígeno diana.

EJEMPLO 15

Los conjugados de anticuerpo anti EGFRvIII-fármaco son potentes inhibidores del crecimiento tumoral en modelos de aloinjerto de cáncer de mama EGFRvIII positivos in vivo

En este Ejemplo, se ensayaron dos conjugados de anticuerpo-fármaco diferentes del anticuerpo anti EGFRvIII de ejemplo H1H1863N2 para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. (La secuencia de aminoácidos y diversas propiedades de H1H1863N2 se exponen en el documento US 61/950.963, presentado el 11 de marzo de 2014). H1H1863N2 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la SEQ ID NO:1; una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la SEQ ID NO:5; regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las SEQ ID NO: 2, 3 y 4, respectivamente; y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.

Se produjo un primer ADC conjugando H1H1863N2 con el maitansinoide DM1 a través de un enlazador MCC no escindible (véanse, por ejemplo, el documento US 5.208.020 y la solicitud de EE. UU. 20100129314) para producir "H1H1863N2-MCC-DM1". Se produjo un segundo ADC conjugando H1H1863N2 con **7** para producir "H1H1863N2-7". Cuando se ensayó la citotoxicidad *in vitro* contra células MMT/EGFRvIII usando el formato de ensayo descrito en el Ejemplo 14, H1H1863N2-MCC-DM1 exhibió una Cl_{50} de 12 nM, mientras que H1H1863N2-7 exhibió una Cl_{50} de solo 0,8 nM. Por lo tanto, *in vitro*, el ADC anti EGFRvIII H1H1863N2-7 exhibió una capacidad de destrucción de células tumorales mucho más potente que el anticuerpo correspondiente conjugado con DM1 a través de un enlazador MCC.

Para comparar la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti EGFRvIII conjugados con MCC-DM1 y **7**, se realizaron estudios en ratones inmunocomprometidos que portaban aloinjertos de cáncer de mama EGFRvIII positivos. Brevemente, los aloinjertos tumorales se establecieron mediante implantación subcutánea de $0,5 \times 10^6$ células MMT/EGFRvIII en el flanco izquierdo de ratones CB17 SCID hembra (Taconic, Hudson, NY). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen promedio de 140 mm^3 (~Día 8), los ratones se asignaron al azar en grupos de siete y se les administró una dosis de ADC anti EGFRvIII usando el formato de enlazador-fármaco MCC-DM1 o **7**. También se evaluaron los reactivos de control, incluidos los ADC de no unión que usan el formato de fármaco-enlazador MCC-

DM1 o 7, y el vehículo PBS. Los ADC se administraron a una dosis de 1 y 5 mg/kg tres veces durante una semana y, a partir de entonces, se controlaron hasta que se alcanzó un tamaño tumoral promedio de aproximadamente 2000 mm³ en el grupo al que se administró solo el vehículo. En este punto, se calculó la inhibición del crecimiento tumoral.

- 5 El tamaño tumoral promedio en relación con el grupo tratado con el vehículo se calculó de la siguiente manera: Los tumores se midieron con calibradores dos veces por semana hasta que el tamaño promedio del grupo de vehículo alcanzó 1000 mm³; el tamaño tumoral se calculó usando la fórmula $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$. La inhibición del crecimiento tumoral se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $(1 - ((T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})/(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}))) \times 100$, donde T (grupo tratado) y C (grupo de control) representan la masa tumoral media el día que el grupo de vehículo alcanzó 1000 mm³. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

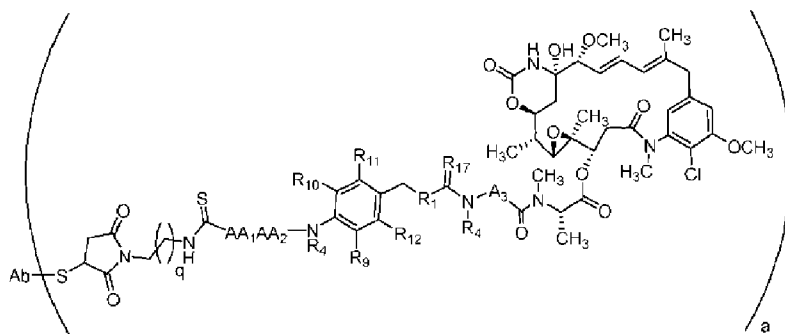
Tabla 3: Tamaño del tumor e inhibición del crecimiento tumoral tras la administración de conjugados de anticuerpo anti EGFRvIII-fármaco y controles, administrados en dosis repetidas

| Grupo de tratamiento | Tamaño final del tumor el Día 8 mm ³ (media ± DE) | Inhibición del crecimiento tumoral promedio (%) |
|-----------------------------|---|---|
| Vehículo PBS | 2253 ± 217 | 0 |
| Control-MCC-DM1 (1 mg/kg) | 2827 ± 278 | -27 |
| Control-MCC-DM1 (5 mg/kg) | 2402 ± 256 | -7 |
| Control-7 (1 mg/kg) | 2729 ± 470 | -22 |
| Control-7 (5 mg/kg) | 2787 ± 503 | -25 |
| H1H1863N2-MCC-DM1 (1 mg/kg) | 931 ± 292 | 62 |
| H1H1863N2-MCC-DM1 (5 mg/kg) | 471 ± 227 | 84 |
| H1H1863N2-7 (1 mg/kg) | 679 ± 265 | 74 |
| H1H1863N2-7 (5 mg/kg) | 96 ± 34 | 102 |

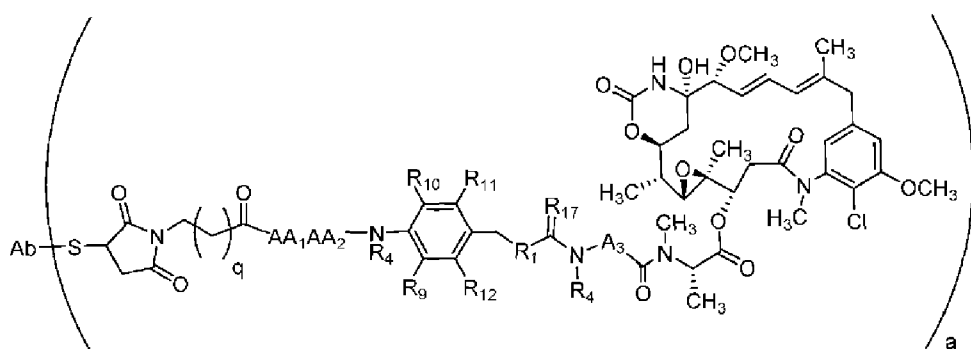
- 15 Como se muestra en este Ejemplo, la mayor inhibición tumoral se observó en ratones a los que se les administró una dosis de 5 mg/kg de H1H1863N2-7, donde se observó una regresión del tumor inicial. La inhibición del crecimiento tumoral del 102 % resultante del tratamiento con 5 mg/kg de H1H1863N2-7 fue significativamente mayor con respecto a la observada después del tratamiento del tumor con 5 mg/kg de H1H1862N2-MCC-DM1 (83 %). La superioridad de la inhibición del crecimiento tumoral inducida por H1H1863N2-7 en comparación con H1H1863N2-MCC-DM1 también se mantuvo con la dosis de 1 mg/kg. No se observó ningún efecto antitumoral en los grupos tratados con ADC de control usando MCC-DM1 o 7.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula:

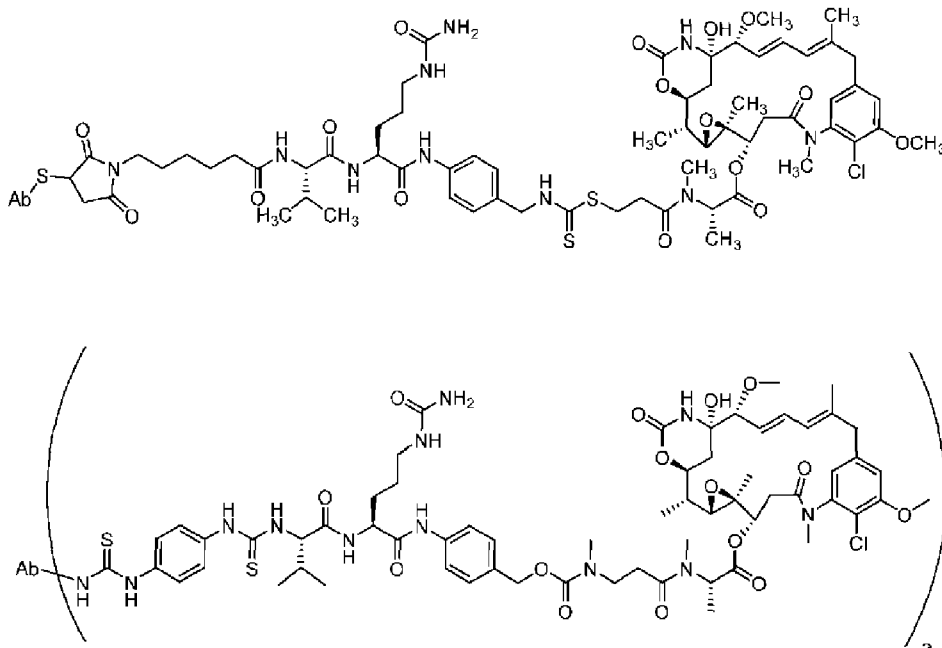


5



10

o



15 en donde:

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

AA₁-AA₂ es un residuo peptídico seleccionado del grupo que consiste en valina-citrulina, citrulina-valina, lisina-fenilalanina, fenilalanina-lisina, valina-asparagina, asparagina-valina, treonina-asparagina, serina-asparagina, asparagina-serina, fenilalanina-asparagina, asparagina-fenilalanina, leucina-asparagina, asparagina-leucina, isoleucina-asparagina, asparagina-isoleucina, glicina-asparagina, asparagina-glicina, ácido glutámico-asparagina, asparagina-ácido glutámico, citrulina-asparagina, asparagina-citrulina, alanina-asparagina y asparagina-alanina;

a es un número entero de 1 a 10;

q es 0 o un número entero de 1 a 5;

5

R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en O, S, NR₁₈ o CR₅R₆;

10

R₄, R₅, R₆ y R₈ son cada uno independientemente H, o un alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterocicilo sustituidos o sin sustituir;

15

R₁₅ es un alquilo opcionalmente sustituido:

20

А 333, 1 3 2.

2. El compuesto de la reivindicación 1 representado por la siguiente estructura:



en donde a es un número entero de 1 a 10.

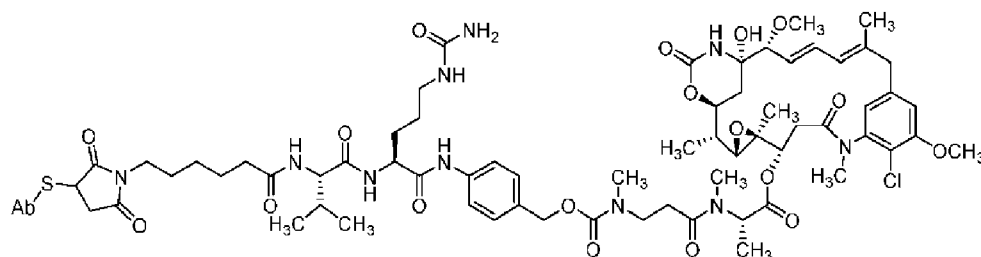
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula:



R_1 es -O-, -S-, -NR₄- o -CR₅R₆-; y

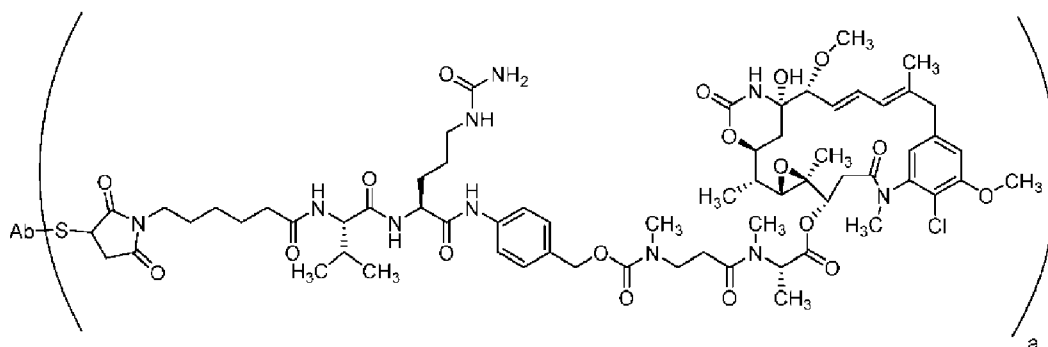
35

4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el compuesto se representa por la siguiente estructura:



en donde Ab es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde el compuesto se representa por la siguiente estructura



- 10 en donde Ab es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y a es un número entero de 1 a 10.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde A₃ es -CH₂CH₂-.

- 15 7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 20 8. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en terapia.

9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en:

- 25 - la reducción, el retraso o la detención de un crecimiento celular anómalo, para su uso en la destrucción de una célula;
 - el tratamiento de un trastorno médico en un individuo; y/o
 - la reducción del tamaño del tumor, la detención del aumento del tamaño de un tumor, la reducción de la proliferación de un tumor o la prevención de la proliferación de un tumor en un individuo que lo necesite.

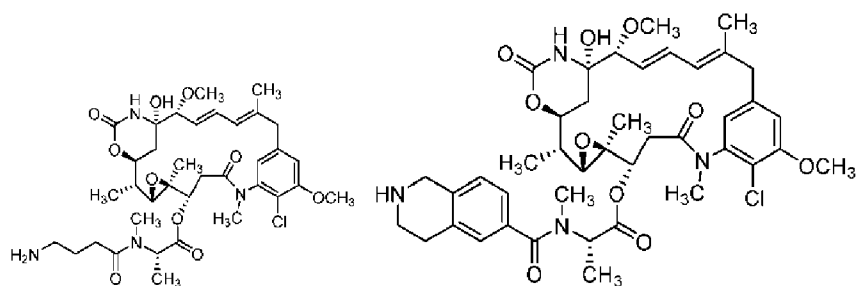
- 30 10. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el compuesto o la composición sirven para su uso en la reducción, el retraso o la detención de un crecimiento celular anómalo, o para su uso en la destrucción de una célula, y la célula es una célula tumoral.

- 35 11. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el compuesto o la composición sirven para su uso en el tratamiento de un trastorno médico en un individuo, y el individuo es un mamífero y/o el trastorno médico se selecciona del grupo que consiste en tumores, cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos óseos y vasculopatías.

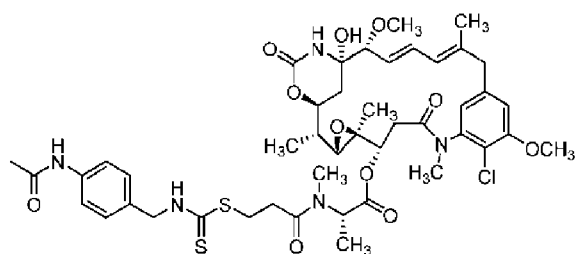
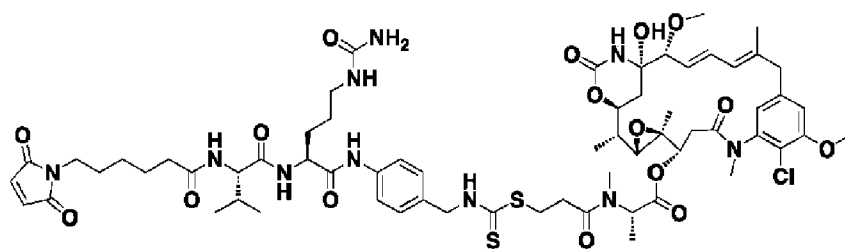
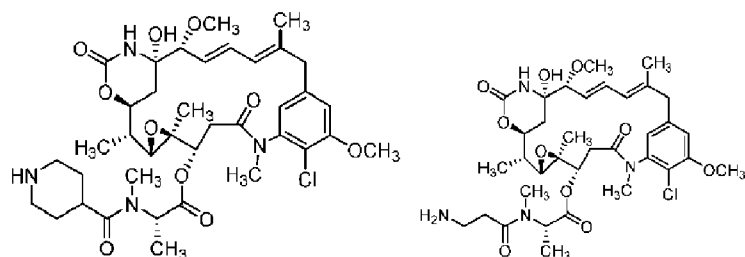
- 40 12. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 11, en donde el compuesto o la composición sirven para su uso en el tratamiento de un trastorno médico en un individuo, y el compuesto sirve para su uso con:

- 45 - una terapia adicional que se administra secuencial o consecutivamente al compuesto, preferentemente, en donde la terapia adicional es radioterapia, quimioterapia o una combinación de ambas; y/o
 - al menos un agente terapéutico adicional.

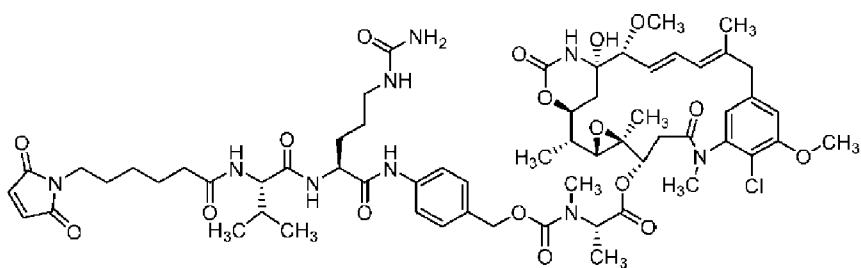
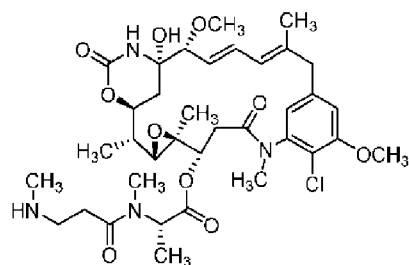
13. Un compuesto que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en

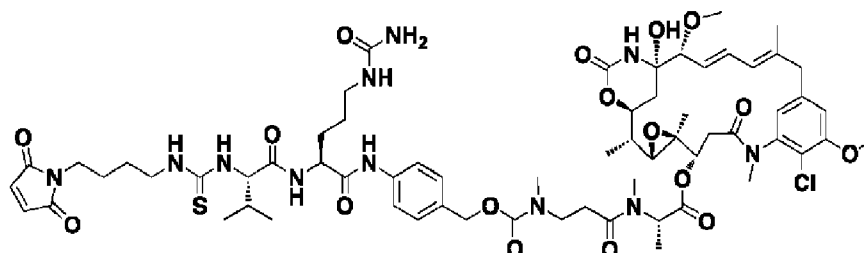
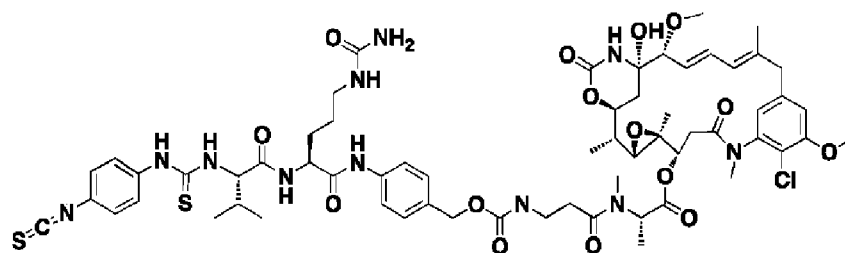


5



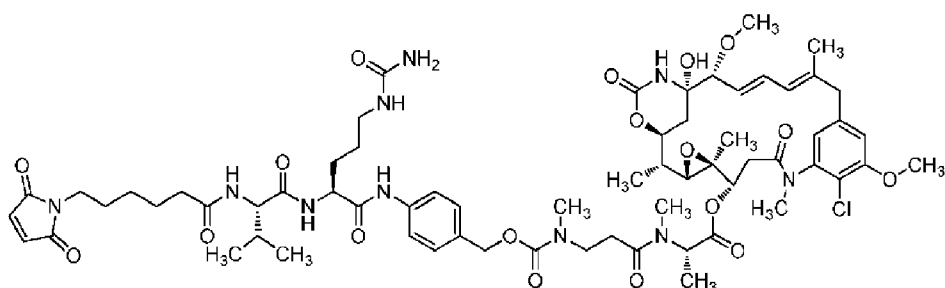
10



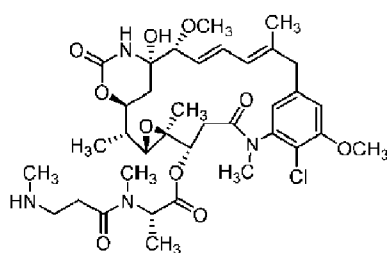


5

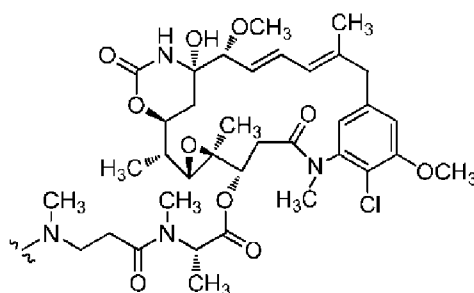
y



10 14. El compuesto de la reivindicación 13, en donde el compuesto es



15 15. Un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugado con una carga activa de la siguiente fórmula:



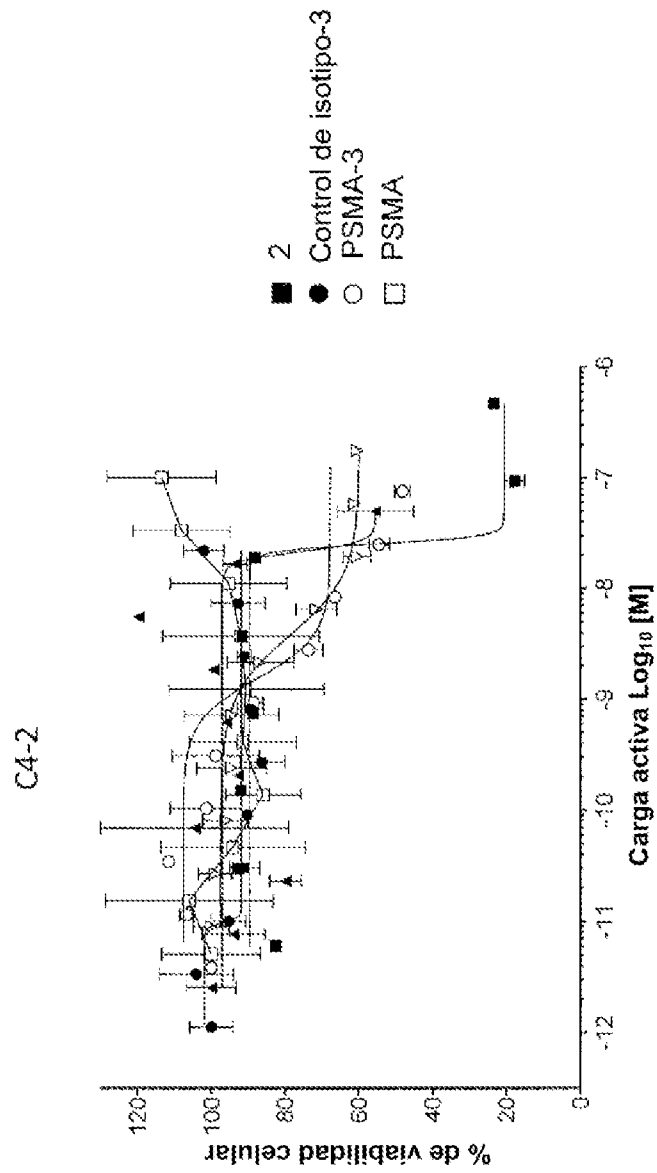


Figura 1A

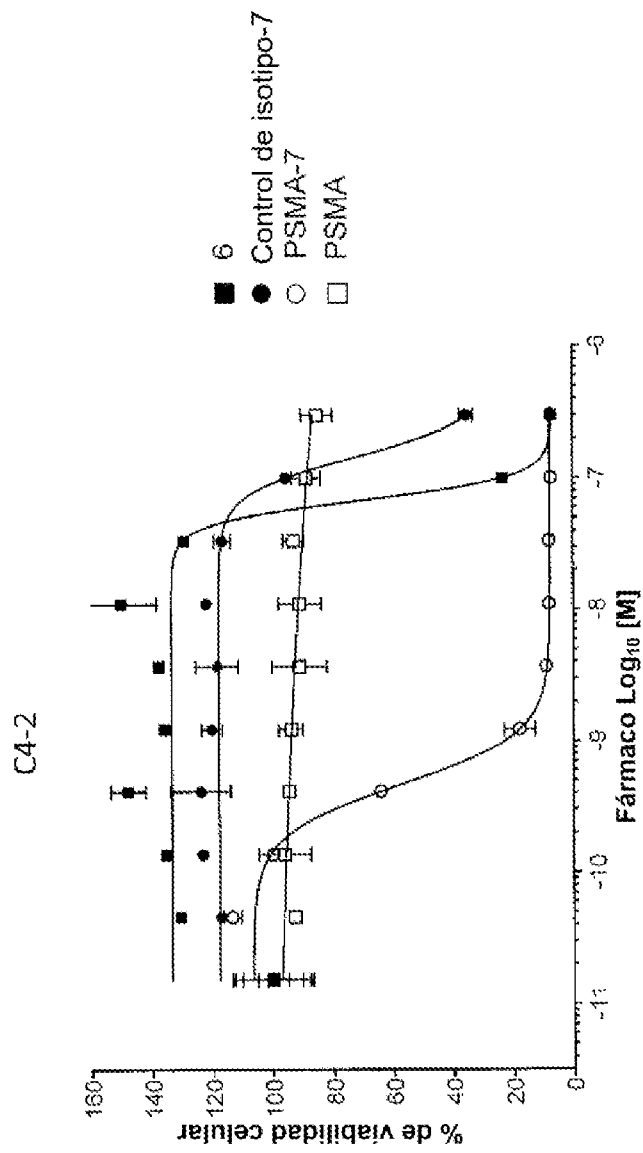


Figura 1B

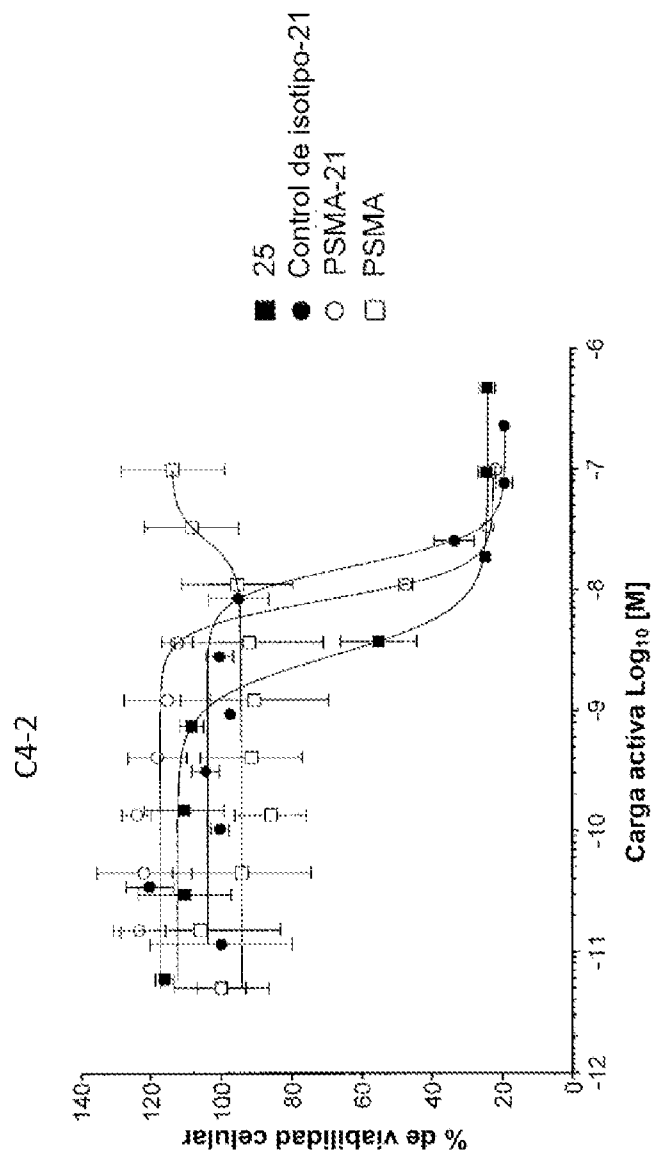


Figura 1C

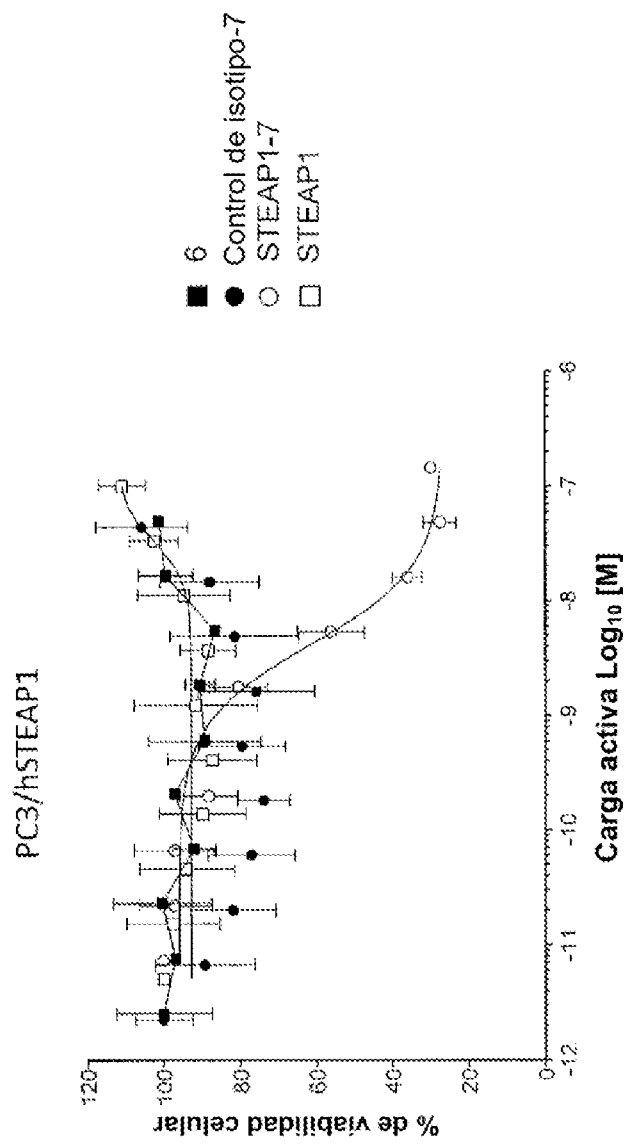


Figura 2

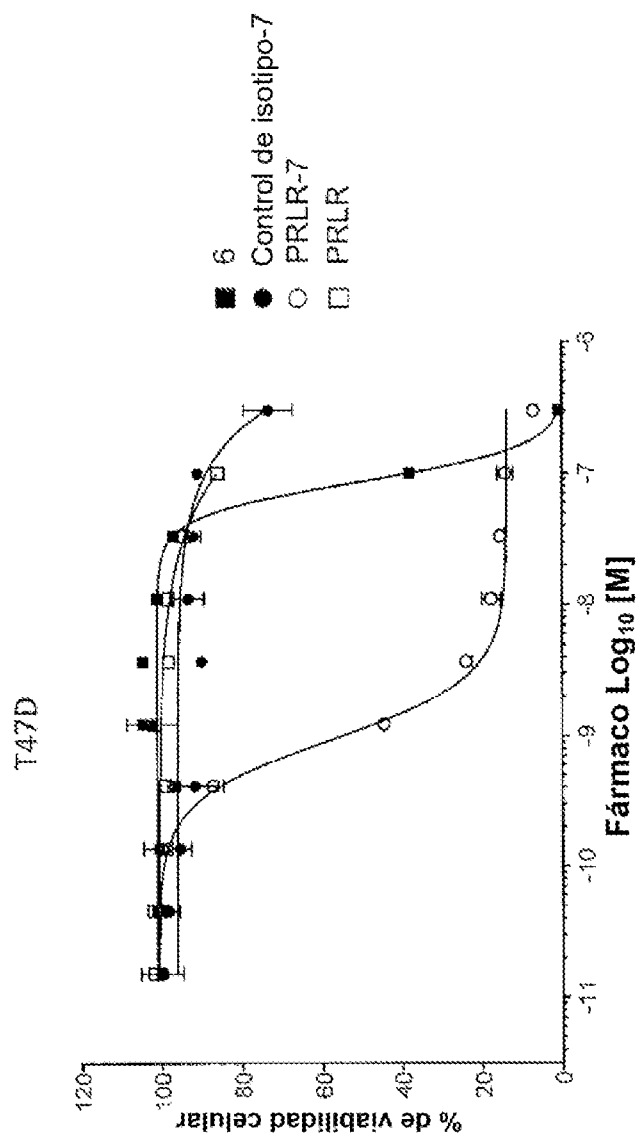


Figura 3

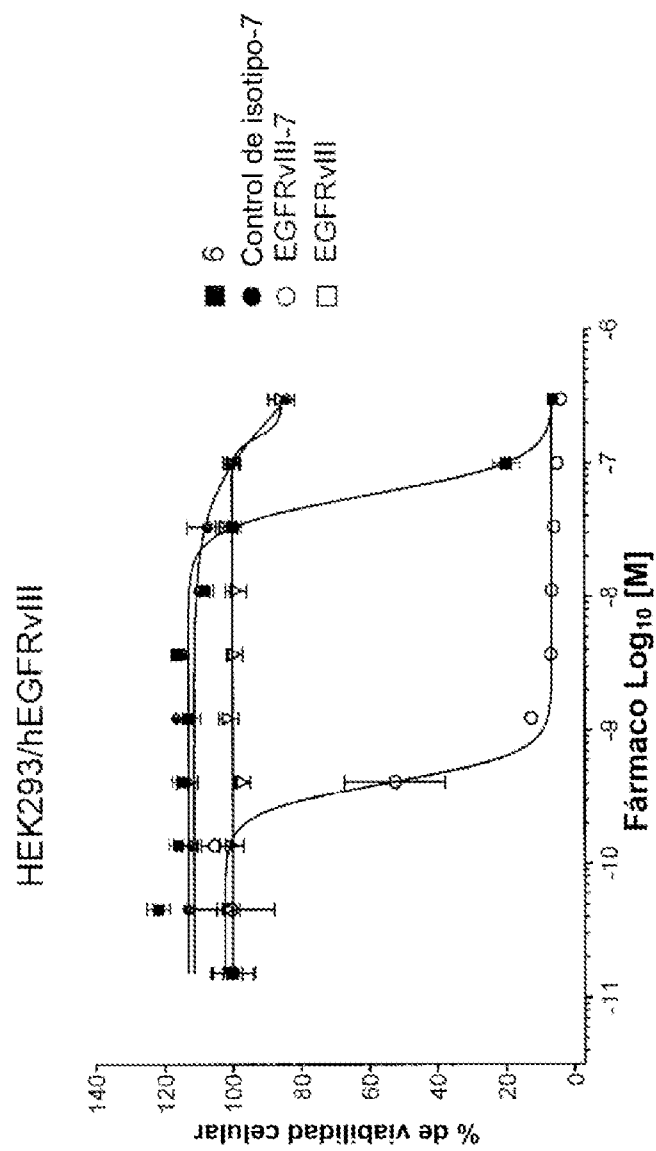


Figura 4

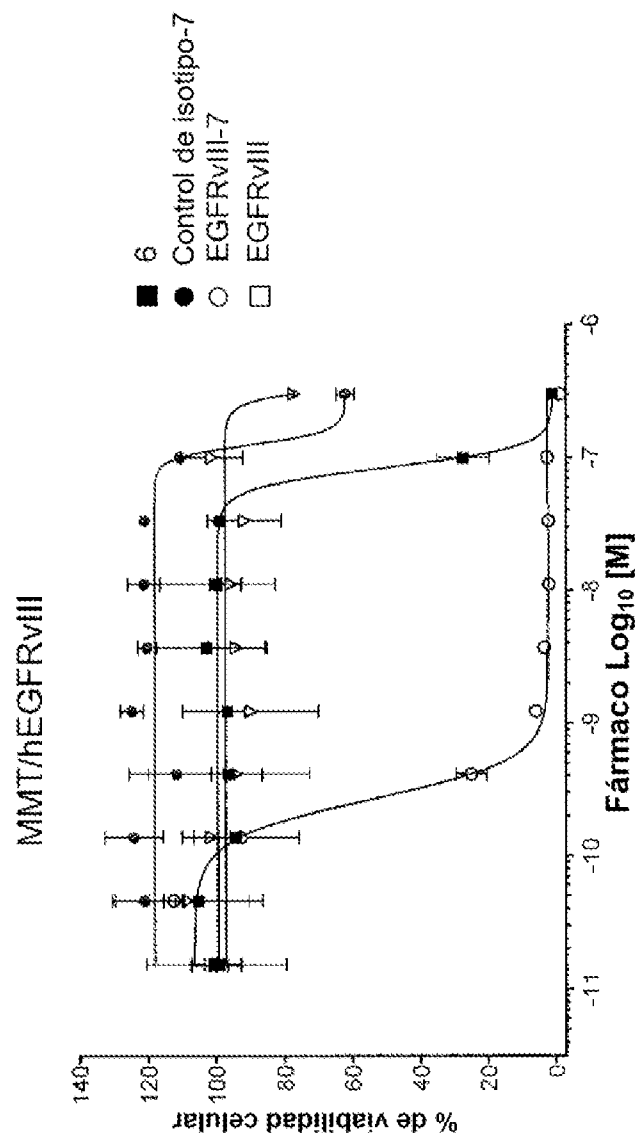


Figura 5

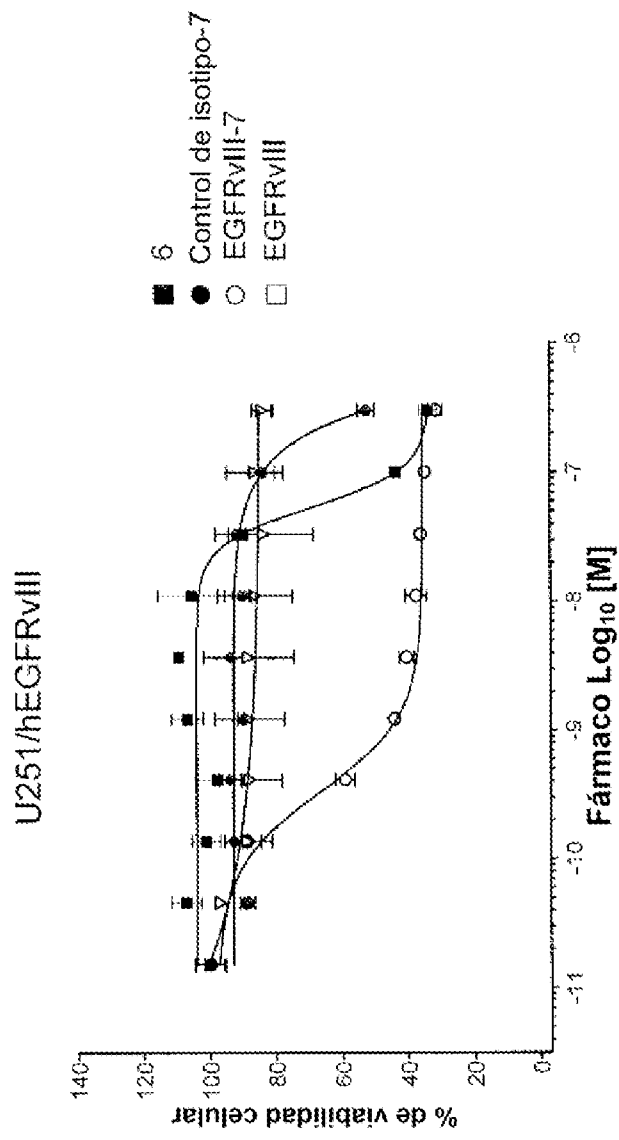


Figura 6

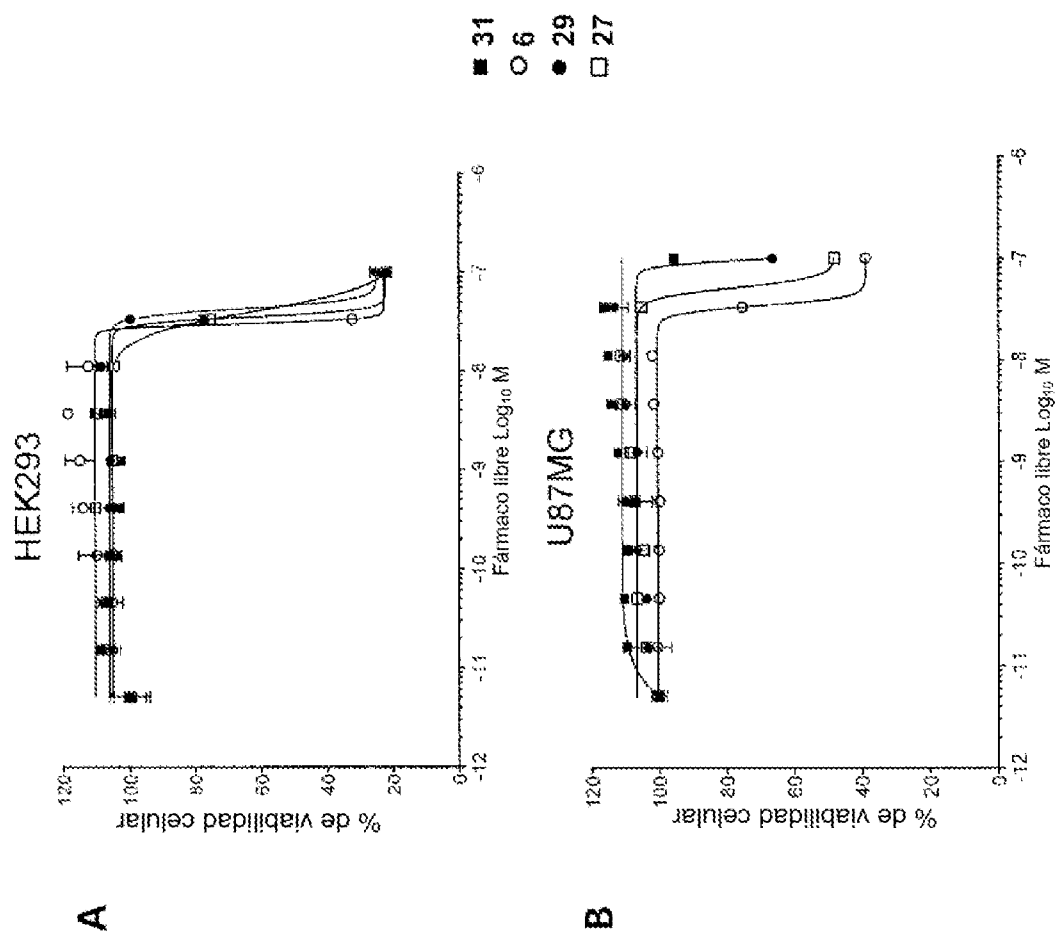


Figura 7

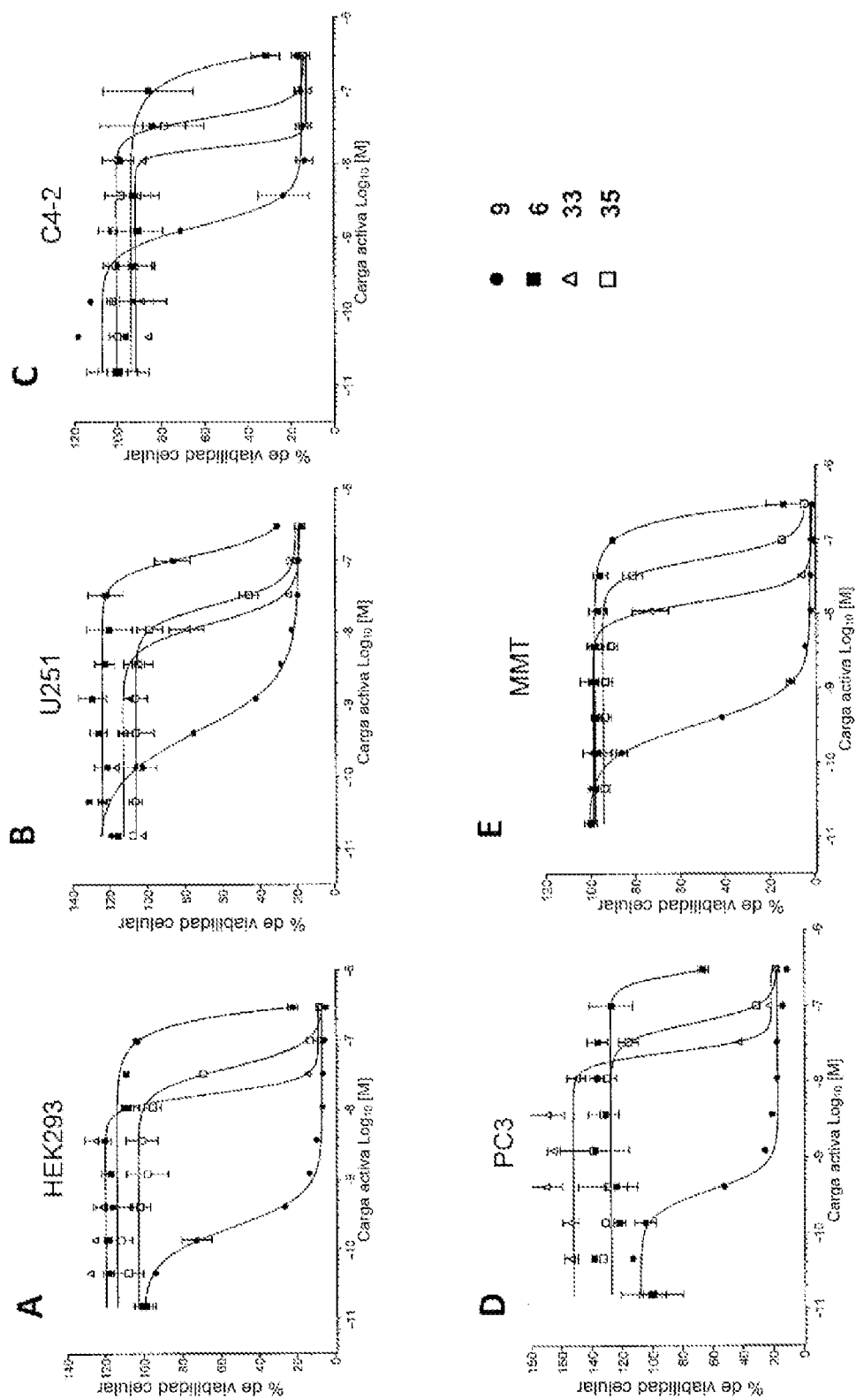


Figura 8