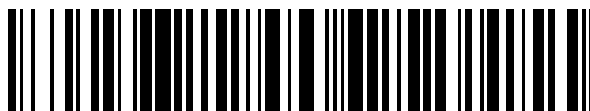


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 783 624**

51 Int. Cl.:

**C07D 519/00** (2006.01)

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2016 PCT/US2016/013136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16115191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2016 E 16703196 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3245213**

54 Título: **Dímeros de benzodiazepina, conjugados de los mismos y métodos de preparación y uso**

30 Prioridad:

**14.01.2015 US 201562103157 P**  
**09.09.2015 US 201562215928 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.09.2020**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)**  
**Route 206 and Province Line Road**  
**Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, YONG;**  
**MCDONALD, IVAR M.;**  
**CHOWDARI, NAIDU S.;**  
**HUYNH, TRAM N.;**  
**BORZILLERI, ROBERT M. y**  
**GANGWAR, SANJEEV**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 783 624 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

Dímeros de benzodiazepina, conjugados de los mismos y métodos de preparación y uso

5 **Campo técnico de la invención**

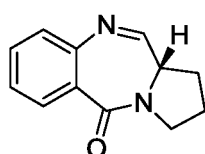
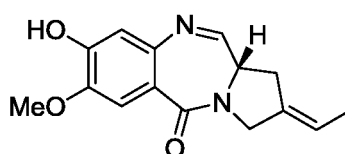
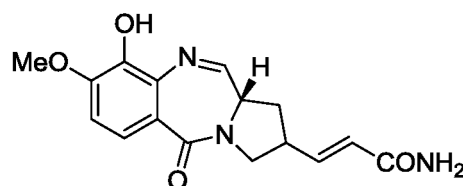
La presente invención se refiere a dímeros de benzodiazepina, compuestos dímero-enlazador derivados de los mismos, y conjugados de los mismos, métodos para su preparación y dichos dímeros, compuestos y conjugados para su uso en métodos.

10

**Antecedentes de la técnica**

Se conocen diversos compuestos citotóxicos de origen natural, que tienen un sistema de anillo de benzodiazepina. Como reflejo de la presencia adicional en el armazón molecular de un anillo de pirrolidina de cinco miembros fusionado con el anillo de diazepina, dichos compuestos se denominan comúnmente pirrolobenzodiazepinas o PBD. Los ejemplos incluyen tomamicina y antramycin.

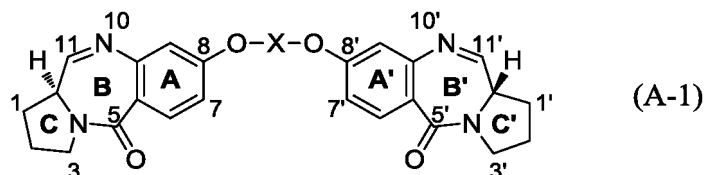
15

**Armazón de PBD****Tomamicina****Antramycin**

Las PBD poseen actividad antibiótica y antitumoral, conduciendo este último rasgo a interesarse por ellos como fármacos antineoplásicos. En cuanto al mecanismo, las PBD se unen al surco menor del ADN de forma selectiva de secuencia y una vez unidos, alquilan el ADN. Se ha estudiado la relación estructura-actividad (REA) de diferentes sustituyentes (Antonow *et al.* 2010; Thurston *et al.* 1999).

Estudios adicionales han demostrado que los dímeros de PBD se muestran especialmente prometedores como agentes antineoplásicos. La estructura núcleo de un dímero de PBD típico puede representarse por la fórmula (A-1), en la que X es un grupo de unión que conecta las dos mitades del dímero.

25

**(A-1)**

30

Al igual que con las PBD monoméricas, los dímeros son unidores-alquilantes del surco menor del ADN. Al ser bifuncional, la alquilación por un dímero da como resultado ADN entrecruzado, lo que dificulta la reparación del ADN. (La alquilación de ADN se produce a través del grupo imina. Las PBD que tienen uno de los grupos imina reducidos aún pueden alquilar ADN, pero no pueden entrecruzarlo. Todavía son biológicamente activas, aunque generalmente menos, pero su perfil farmacocinético diferente puede ser preferible para algunas aplicaciones). Para obtener una revisión sobre la evolución de los PBD como agentes antitumorales, desde monómeros naturales hasta monómeros sintéticos y dímeros sintéticos, véase Hartley 2011.

35

La REA de los dímeros de PBD se ha explorado a través de sustituyentes en los anillos A/A' y C/C', la insaturación en los anillos C/C', la estructura y la longitud del grupo de unión X y la oxidación o reducción de los dobles enlaces de imina en los anillos B/B', y combinaciones de dichas características. Véase Bose *et al.* 1992, Gregson *et al.* 1999, Gregson *et al.* 2001a y 2001b, Gregson *et al.* 2004, Gregson *et al.* 2009, Hartley *et al.* 2012, Howard *et al.* 2007, Howard *et al.* 2009a, Howard *et al.* 2010, Howard *et al.* 2013a y 2013b, Liu *et al.* 2007, Thurston *et al.* 1996, Thurston *et al.* 2006 y Thurston *et al.* 2008. La mayoría de los dímeros de PBD se unen a través de un puente 8/8' como se ha mostrado anteriormente, pero también se ha desvelado un puente 7/7' (Howard *et al.* 2009b).

45

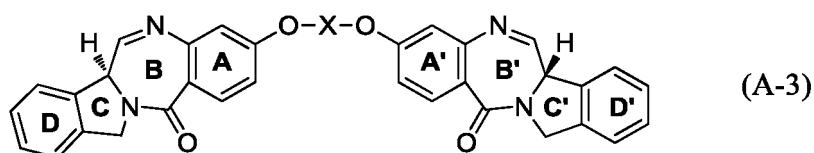
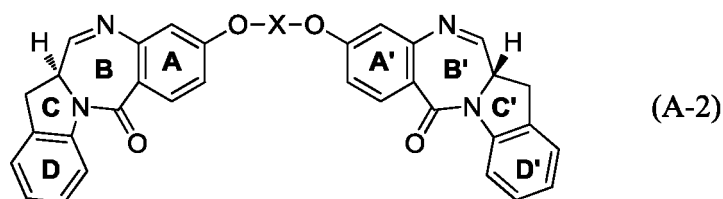
Un tipo de agente antineoplásico que está generando un gran interés es un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF, también denominado inmunoconjugado). En un CAF, un agente terapéutico (también denominado fármaco, carga útil u ojiva) está unido covalentemente a un anticuerpo cuyo antígeno es expresado por una célula cancerosa (antígeno asociado a tumor). El anticuerpo, mediante la unión al antígeno, entrega el CAF al sitio del cáncer. Allí, la escisión del enlace covalente o la degradación del anticuerpo conduce a la liberación del agente terapéutico. Por el contrario, mientras el CAF circula en el sistema sanguíneo, el agente terapéutico se mantiene inactivo debido a su enlace

50

covalente con el anticuerpo. Por tanto, el agente terapéutico utilizado en un CAF puede ser mucho más potente (es decir, citotóxico) que los agentes quimioterápicos normales debido a su liberación localizada. Para obtener una revisión sobre los CAF, véase Schrama *et al.* 2006.

Se han propuesto dímeros de PBD como fármaco en un CAF. La unión del enlazador que se conecta con el anticuerpo puede realizarse a través de un grupo funcional ubicado en un anillo C/C', el grupo de unión X o por adición a través del grupo imina en un anillo B/B'. Véase Beau-Larvor *et al.* 2014, Bouchard *et al.* 2013, Commercon *et al.* 2013a y 2013b, Flygare *et al.* 2013, Gauzy *et al.* 2012, Howard 2104a-2014e, Howard *et al.* 2011, Howard *et al.* 2013c y 2013d, Howard *et al.* 2014a-2014 h, Jeffrey *et al.* 2013, Jeffrey *et al.* 2014a y 2014b, y Zhao *et al.* 2014.

También se ha propuesto otro tipo de dímero de benzodiazepina como un agente terapéutico para su uso en CAF. Estructuralmente, este tipo puede verse como un dímero de PBD que tiene adicionalmente un anillo de fenilo condensado con cada uno de los anillos C/C', como se muestra en las fórmulas (A-2) y (A-3). Véase Chari *et al.* 2013, Li *et al.* 2013, Fishkin *et al.* 2014, Li *et al.* 2014.

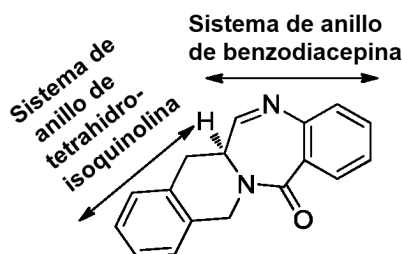


También se han desvelado compuestos de benzodiazepina que tienen otros sistemas de anillo, tales como una tetrahydro-isoquinolino[2,1-c][1,4]benzodiazepina. Kothakonda *et al.* 2004. Fishkin *et al.* 2012 describe compuestos de benzodiazepinas útiles en la preparación de conjugados. Li *et al.* describe derivados de benzodiazepina con actividad antiproliferativa.

Las citas completas de los documentos citados en el presente documento por el primer autor o inventor y el año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva.

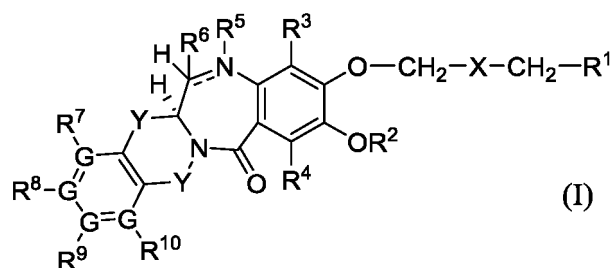
### Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos dímeros de benzodiazepina, preferentemente, en los que al menos una de las unidades de benzodiazepina tiene un sistema de anillo de tetrahydroisoquinolina (THIQ) condensado con un sistema de anillo de benzodiazepina. Opcionalmente, el enlace de imina en el sistema de anillo de benzodiazepina puede reducirse.



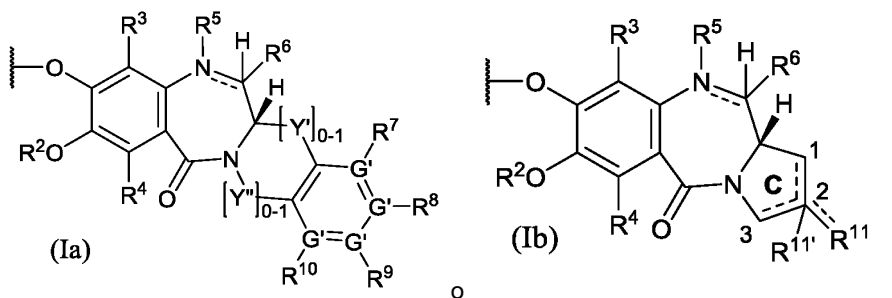
Ambas unidades (mitades) del dímero pueden tener un sistema de anillo de THIQ ("dímero THIQ-THIQ" u "homodímero THIQ") o una unidad puede tener un sistema de anillo de THIQ mientras que la otra unidad tiene un sistema de anillo de benzodiazepina diferente, tal como un sistema de anillo de PBD (generalmente, un "heterodímero de THIQ" o, en este ejemplo particular, un "dímero THIQ-PBD"). En un dímero THIQ-THIQ, las dos unidades pueden ser idénticas ("dímero THIQ-THIQ simétrico") o diferentes ("dímero THIQ-THIQ asimétrico").

Por tanto, la presente invención proporciona un dímero de benzodiazepina que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



en la que

5  $R^1$  es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):



10 cada G y G' es C o N, a la condición de que no más de dos G o dos G' sean N; cada  $R^2$  es independientemente H o alquilo  $C_1-C_5$ ;

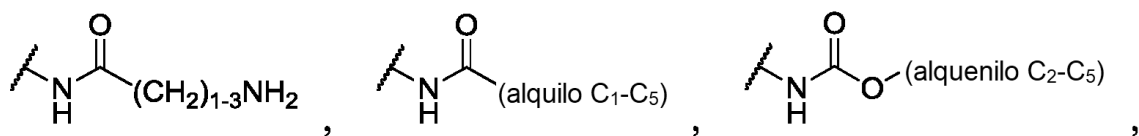
cada  $R^3$  y  $R^4$  es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo  $C_1-C_3$ , O(alquilo  $C_1-C_3$ ), ciano,  $(CH_2)_{0-5}NH_2$  o  $NO_2$ ;

cada línea doble  $\equiv$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

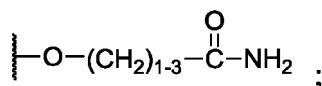
15 cada  $R^5$  es H si la línea doble  $\equiv$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

cada  $R^6$  es H, OH,  $SO_3Na$  o  $SO_3K$  si la línea doble  $\equiv$  al C al que está unida (es decir, con la cual está asociada) es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

20 cada  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_5$ ,  $C\equiv C(CH_2)_{1-5}X^2$ , OH, O(alquilo  $C_1-C_5$ ), ciano,  $NO_2$ , F, Cl, Br,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}$ (alquilo  $C_{1-3}$ ),  $(CH_2)_{0-5}X^2$ ,  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ ;



25 o

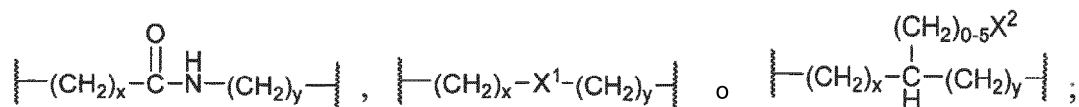


30 o donde un  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  está unido (es decir, está asociada con) a un G o G' que es N, tal como  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  está ausente;

las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2- $R^{11}$ ;

35  $R^{11}$  es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo  $C_1-C_5$ ), CH=CH $(CH_2)_{1-5}X^2$ ,  $C\equiv C(CH_2)_{1-5}X^2$ , alquilo  $C_1-C_5$ , OH, O(alquilo  $C_1-C_5$ ), ciano,  $NO_2$ , F, Cl, Br,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}$ (alquilo  $C_{1-3}$ ),  $(CH_2)_{0-5}X^2$ , arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$ ,  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ ;

$R^{11}$  está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2- $R^{11}$  y de lo contrario es H; X es



$\text{X}^1$  es  $\text{CH}_2$ , O, NH,  $\text{S(O)}_{0-2}$ , cicloalquileo o heterocicloalquileo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ , arileno de 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ , heteroarileno de 5 miembros sin sustituir o sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ ;

cada  $\text{X}^2$  es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ), O(alquileo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{N}_3$ , CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{NH}_2$ , NH(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_5$ ), N(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_5$ )<sub>2</sub>, SH, CHO, N( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{NHNH}_2$  o C(=O) $\text{NHNH}_2$ ;

x e y son independientemente 1, 2 o 3;

cada Y es independientemente  $\text{CH}_2$ , C=O o  $\text{CHR}^{12}$ ; en la que cada  $\text{R}^{12}$  es independientemente F, Cl, Br o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ; e

Y' e Y'' son independientemente  $\text{CH}_2$ , C=O o  $\text{CHR}^{12}$ ; en la que cada  $\text{R}^{12}$  es independientemente F, Cl, Br o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ , a condición de que esté presente (es decir, el subíndice asociado es 1) al menos uno de Y' e Y'';

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un dímero de fórmula (I) unido covalentemente a un resto de direccionamiento que se une específicamente o preferentemente a una entidad química en una célula diana, célula diana que es preferentemente una célula cancerosa. Preferentemente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal; incluso más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano, y la entidad química es un antígeno asociado a tumor. El antígeno asociado a tumor puede ser uno que se presenta en la superficie de una célula cancerosa o uno que es secretado por una célula cancerosa en el espacio extracelular circundante. Preferentemente, el antígeno asociado a tumor es uno que es sobreexpresado por la célula cancerosa en comparación con las células normales o uno que es expresado por las células cancerosas pero no por las células normales.

En otra realización, se proporciona un dímero de acuerdo con la fórmula (I) unido covalentemente a un resto enlazador que tiene un grupo funcional reactivo, adecuado para la conjugación con un resto de direccionamiento.

En otra realización, se proporciona un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento para su uso en un método para tratar un cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento. En otra realización, se proporciona el uso de un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer. Un dímero de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto de direccionamiento también puede usarse para inhibir la proliferación, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, de células cancerosas. Especialmente, el cáncer puede ser cáncer de pulmón o gástrico.

### Breve descripción de los dibujos

Las **Fig. 1, 2 y 3**, muestran esquemas para la síntesis de diversos intermedios usados en la preparación de dímeros de la presente invención.

La **Fig. 4** muestra un esquema genérico para la preparación de dímeros simétricos THIQ-THIQ. La **Fig 4a** muestra la síntesis de un dímero THIQ-THIQ particular.

La **Fig. 5** muestra un esquema genérico para preparar dímeros asimétricos THIQ-THIQ.

La **Fig. 6** muestra un esquema para preparar un dímero de esta invención en donde el puente que une las dos mitades del dímero no es bilateralmente simétrico.

Las **Figs. 7a y 7b** muestran esquemas para la preparación de dímeros THIQ-PBD.

La **Fig. 8** muestra un esquema para la preparación de dímeros THIQ-THIQ asimétricos adicionales.

La **Fig. 9** muestra un esquema para la preparación de otro dímero THIQ-PBD.

Las **Figs. 10 y 11** muestran esquemas para la síntesis de dímeros de esta invención, en donde el puente que conecta las dos mitades del dímero tiene un grupo amina, adecuado para la unión de un grupo enlazador para la construcción de un ADC.

Las **Figs. 12 y 13** representan esquemas para la síntesis de compuestos enlazadores de dímeros denominados "tipo (a)" a continuación en el presente documento.

Las **Figs. 14 y 15** representan un esquema para la síntesis de intermedios usados para fabricar compuestos de unión a dímero denominados "tipo (b)" a continuación en el presente documento, mientras que la **Fig. 16** representa la síntesis de dicho compuesto de unión a dímero a partir de los intermedios así preparados.

La **Fig. 17** muestra un esquema para la preparación de un dímero del tipo denominado dímero THIQ-AZI a continuación en el presente documento.

Las **Figs. 18a y 18b** muestran, en combinación, la síntesis de un dímero adecuado para preparar compuestos dímero-enlazador de tipo (a) y un dímero-enlazador fabricado a partir del mismo.

Las **Figs. 19 y 20** muestran esquemas para la síntesis de dímeros THIQ-THIQ adicionales.

Las **Figs. 21 y 22** muestran esquemas para la síntesis de compuestos dímero-enlazadores de "tipo (b)" adicionales.

La **Fig. 23** se refiere a la síntesis de compuestos enlazadores de dímeros que tienen un grupo alquilamino, que pueden actuar como donantes de amina en una conjugación mediada por transglutaminasa.

## Descripción de realizaciones

### Definiciones

"Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o variantes monocatenarias de los mismos. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada ( $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera ( $V_L$  o  $V_K$ ) y una región constante de cadena ligera que comprende un único dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) más conservadas. Cada  $V_H$  y  $V_L$  comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno X si el anticuerpo se une al antígeno X con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $6 \times 10^{-9}$  M o menos, más preferentemente  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, incluso más preferentemente  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada puede diseñarse por ingeniería genética para que afecte al tipo o la extensión de la glucosilación, prolongue la semivida del anticuerpo, potencie o reduzca las interacciones con las células efectoras o el sistema del complemento, o module alguna otra propiedad. La modificación por ingeniería industrial puede lograrse mediante el reemplazo, la adición o la supresión de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio con un dominio de otro tipo de inmunoglobulina o una combinación de los anteriores.

"Fragmento de unión a antígeno" y "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo") significan uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, 6ª Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes. Son fragmentos de unión a antígeno preferidos los fragmentos Fab,  $F(ab')_2$ , Fab', Fv y Fd. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario, o scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también están incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

Un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del antígeno X). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas X de otras especies. En determinadas realizaciones, un anticuerpo aislado se une específicamente al antígeno X humano y no reacciona de forma cruzada con otros antígenos antígeno X (no humanos). Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos.

"Anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" significa una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, que muestra una especificidad y afinidad de unión única para un epítipo particular.

- "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto la región marco conservada como la CDR (y la región constante, si está presente) derivan de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco conservadas humanas.
- "Anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única, que tiene regiones variables en las que tanto la región marco conservada como la CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.
- "Alifático" significa un resto hidrocarbonado no aromático de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, que tiene el número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, como en "alifático C<sub>3</sub>", "alifático C<sub>1-5</sub>", "alifático C<sub>1-C<sub>5</sub></sub>", o "alifático de C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>", siendo las últimas tres frases sinónimos de un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, cuando el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (de 2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados). Se aplica una comprensión similar al número de carbonos en otros tipos, como en el alqueno C<sub>2-4</sub>, cicloalifático C<sub>4-C<sub>7</sub></sub>, etc.
- "Alquilo" significa un resto alifático saturado, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquilo C<sub>1-C<sub>4</sub></sub> incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, t-butilo, 1-butilo, 2-butilo y similares. "Alquileo" significa un homólogo divalente de un grupo alquilo, tal como CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.
- "Alquenilo" significa un resto alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los restos alquenilo C<sub>2-C<sub>4</sub></sub> incluyen, pero sin limitación, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, E- (o Z-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.
- "Alquinilo" significa un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, siendo aplicable la misma convención para designar el número de átomos de carbono. A modo de ilustración, los grupos alquinilo C<sub>2-C<sub>4</sub></sub> incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.
- "Cicloalifático" significa un resto hidrocarbonado no aromático saturado o insaturado, que tiene de 1 a 3 anillos, teniendo cada anillo de 3 a 8 (preferentemente de 3 a 6) átomos de carbono. "Cicloalquilo" significa un resto cicloalifático en el que cada anillo está saturado. "Cicloalquenilo" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. "Cicloalquinilo" significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. A modo de ilustración, los restos cicloalifáticos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Son restos cicloalifáticos preferidos los cicloalquilo, especialmente ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. "Cicloalquileo" significa un homólogo divalente de un grupo cicloalquilo.
- "Heterocicloalifático" significa un resto cicloalifático en el que, en al menos un anillo del mismo, se han reemplazado hasta tres (preferentemente de 1 a 2) carbonos con un heteroátomo seleccionado independientemente entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden estar oxidado y el N opcionalmente puede estar cuaternizado. De manera similar, "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo", y "heterocicloalquinilo" significan un resto cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en el que al menos un anillo del mismo se ha modificado de esta manera. Los restos heterocicloalifáticos de ejemplo incluyen aziridinilo, azetidínilo, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidrotiopiranil sulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, sulfóxido de tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo y similares. "Heterocicloalquileo" significa un homólogo divalente de un grupo heterocicloalquilo.
- "Alcoxi", "ariloxi", "alquiltio", y "ariltio" significan -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Son ejemplos metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.
- "Halógeno" o "halo" significa flúor, cloro, bromo o yodo.
- "Arilo" significa un resto hidrocarbonado que tiene un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos en el sistema de anillo pueden condensarse entre sí (como en el naftilo) o unirse entre sí (como en el bifenilo) y pueden condensarse con o

unirse a anillos no aromáticos (como en el indanilo o el ciclohexilfenilo). A modo de ilustración adicional, los restos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antracenilo y acenafilo. "Arieno" significa un homólogo divalente de un grupo arilo, por ejemplo, 1,2-fenileno, 1,3-fenileno o 1,4-fenileno.

- 5 "Heteroarilo" significa un resto que tiene un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O o S, donde el N y S opcionalmente pueden estar oxidado y el N opcionalmente puede estar cuaternizado. Dicho anillo aromático que contiene al menos un heteroátomo puede condensarse con otros tipos de anillos (como en el benzofuranilo o el tetrahidroisoquinolilo) o unirse directamente a
- 10 otros tipos de anillos (como en el fenilpiridilo o el 2-ciclopentilpiridilo). A modo de ilustración adicional, los restos heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, benzoimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares.
- 15 "Heteroarileno" significa un homólogo divalente de un grupo heteroarilo.

Cuando se indica que un resto puede estar sustituido, tal como mediante el uso de la frase "sin sustituir o sustituido" u "opcionalmente sustituido" como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> sin sustituir o sustituido" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", dicho resto puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, preferentemente de

20 uno a cinco en número, más preferentemente uno o dos en número. Los sustituyentes y los patrones de sustitución pueden ser seleccionados por un experto en la materia, teniendo en cuenta el resto al que está unido el sustituyente, para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse mediante técnicas conocidas en la materia, así como los métodos establecidos en el presente documento.

- 25 "Arientalquilo", "(heterocicloalifático)alquilo", "arilalqueno", "arilalquino", "biarilalquilo" y similares significan un resto alquilo, alqueno o alquino, según el caso, sustituido con un arilo, heterocicloalifático, biarilo, etc., resto, según el caso, con la valencia abierta (insatisfecha) en el resto alquilo, alqueno o alquino, por ejemplo, como en bencilo, fenetilo, N-imidazoliletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, "alquilarilo", "alquencilcualquilo" y similares significan un resto arilo, cicloalquilo, etc., según el caso, sustituido con un resto alquilo, alqueno, etc., según el
- 30 caso, por ejemplo, como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. "Hidroxi-alquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo" y similares significan un resto alquilo, arilo, etc., resto, según el caso, sustituido con uno o más del sustituyente identificado (hidroxilo, halo, etc., según el caso).

Por ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, pero sin limitación, alquilo (especialmente metilo o etilo), alqueno (especialmente alilo), alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (especialmente

35 fluoro), haloalquilo (especialmente trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (especialmente hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxi-alquilo), -O(haloalquilo) (especialmente -OCF<sub>3</sub>), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxi-alquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -

40 OC(=O)(hidroxi-alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxi-alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxi-alquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo), -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub> y similares.

45 Cuando el resto que está sustituido es un resto alifático, son sustituyentes preferidos arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxi-alquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxi-alquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -

50 OC(=O)(hidroxi-alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxi-alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxi-alquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Son sustituyentes más preferidos halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo), -

55 -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Son especialmente preferidos fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, O(alquilen C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)OH y O(alquilen C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)halo.

60 Cuando el resto que está sustituido es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, son sustituyentes preferidos alquilo, alqueno, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxi-alquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxi-alquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -

65 OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxi-alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxi-alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxi-alquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -



OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Son sustituyentes más preferidos alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. Se prefieren especialmente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ciano, nitro halo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

Cuando se establece un intervalo, como en "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>" o "del 5 al 10 %", dicho intervalo incluye los puntos finales del intervalo, como en C<sub>1</sub> y C<sub>5</sub> en el primer caso y el 5 % y el 10 % en el segundo caso.

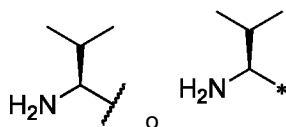
A menos se indiquen específicamente estereoisómeros particulares (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro pertinente en una fórmula estructural, mediante la representación de un doble enlace que tenga configuración E o Z en una fórmula estructural o mediante el uso de nomenclatura de designación estereoquímica), todos los estereoisómeros se incluyen dentro del alcance de la invención, como compuestos puros así como mezclas de los mismos. A menos que se indique lo contrario, la presente invención abarca enantiómeros, diastereómeros, isómeros geométricos individuales y combinaciones y mezclas de los mismos.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos pueden tener formas tautoméricas (por ejemplo, formas ceto y enol), formas de resonancia y formas zwitteriónicas que son equivalentes a las representadas en las fórmulas estructurales utilizadas en el presente documento y que las fórmulas estructurales abarcan dichas formas tautoméricas, de resonancia o zwitteriónicas.

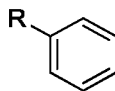
"Ester farmacéuticamente aceptable" significa un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto parental o una sal del mismo o una tiene actividad, por sí mismo, similar a la del compuesto parental. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> o de alquino C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, especialmente metilo, etilo o n-propilo.

"Sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de un compuesto adecuado para formulación farmacéutica. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición de ácido, tal como un sulfato, bromhidrato, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), yodhidrato, nitrato, clorhidrato, lactato, metilsulfato, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato y similares. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos ácidos, la sal puede ser una sal tal como una sal de calcio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de meglumina, sal de amonio, sal de cinc, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de litio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de 4-fenilciclohexilamina, sal de benzatina, sal de sodio, sal de tetrametilamonio y similares. También se incluyen las formas cristalinas polimórficas y los solvatos dentro del alcance de la presente invención.

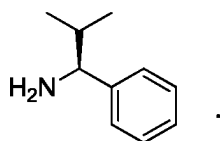
En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, una línea ondulada (~~~~~) transversal a un enlace o un asterisco (\*) al final del enlace denota un sitio de unión covalente. Por ejemplo, una afirmación de que R es



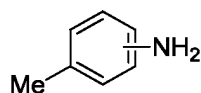
en la fórmula



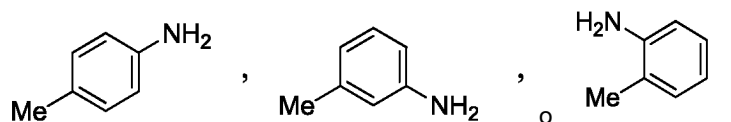
se refiere a



En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, un enlace que atraviesa un anillo aromático entre dos carbonos del mismo significa que el grupo unido al enlace puede estar ubicado en cualquiera de las posiciones disponibles del anillo aromático. A modo de ilustración, la fórmula



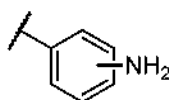
representa



## DÍMEROS

En las fórmulas (I), (Ia) y (Ib), preferentemente cada  $R^2$  es Me. Más preferentemente, cada  $R^2$  es Me y cada  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^{10}$  es H (con respecto a  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^{10}$ , cuando están presentes).

En las fórmulas (I) y (Ia), preferentemente cada  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^{10}$  es H y cada  $R^9$  es independientemente H, OH, OMe,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ ,  $OCH_2CH_2OH$ , o

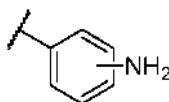


(especialmente el *para*-isómero).

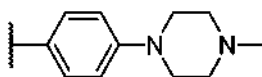
En una realización preferida de la fórmula (Ia), cada  $G'$  es C,  $Y'$  e  $Y''$  son ambos  $CH_2$ . En otra realización preferida de la fórmula (Ia), un  $G'$  es N,  $Y'$  es  $CH_2$ , e  $Y''$  está ausente (es decir, el subíndice asociado es 0).

Preferentemente, en la fórmula (I), cada  $X^2$  es independientemente Me,  $CO_2H$ ,  $NH_2$ ,  $NH$ (alquilo  $C_1-C_5$ ),  $N$ (alquilo  $C_1-C_5$ ) $_2$ , SH, CHO,  $N(CH_2CH_2)_2N$ (alquilo  $C_1-C_3$ ),  $NHNH_2$  o  $C(=O)NHNH_2$ .

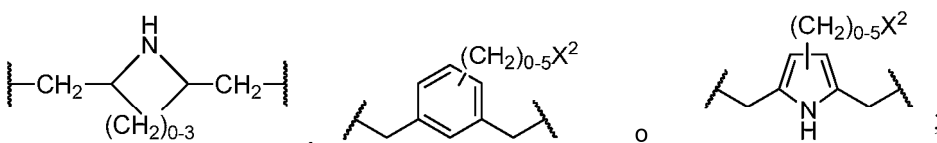
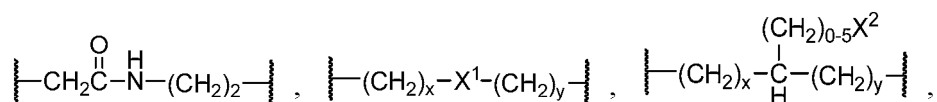
En la fórmula (Ib),  $R^{11}$  preferentemente es H,  $=CH_2$ ,  $CH=CHMe$ ,  $=CHMe$ ,  $C\equiv CCH_2NH_2$ ,



(especialmente el *para*-isómero), o

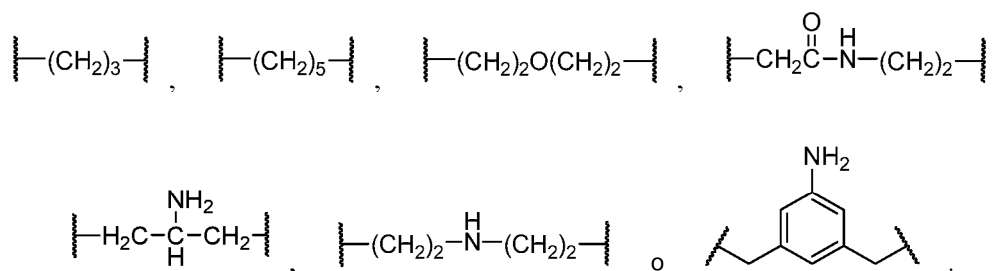


En la fórmula (I), X preferentemente es



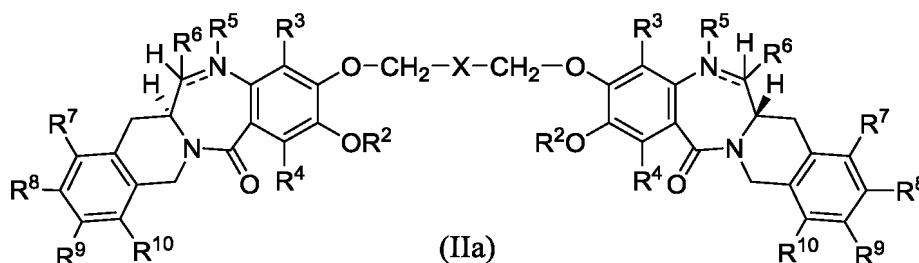
donde  $X^1$  es  $CH_2$ , O o  $NH$ ;  $X^2$  es  $CO_2H$  o  $NH_2$ ; y la suma de x e y es 2 o 4.

Más preferentemente, X es



Preferentemente, donde una fórmula incluye dos sistemas de anillo de benzodiazepina, cada uno de los cuales se muestra con una línea doble  $\text{---}$ , al menos una de tales dobles líneas es un doble enlace.

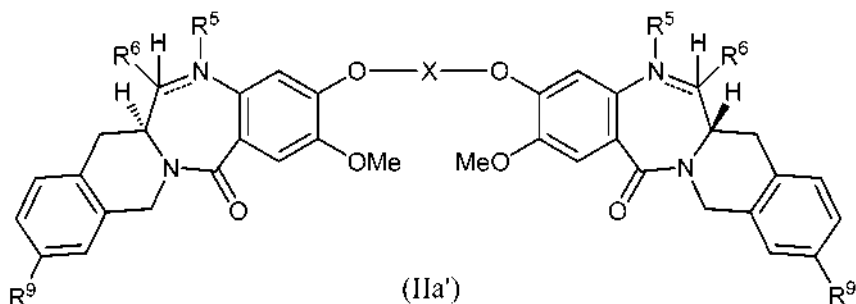
Un dímero de la presente invención puede ser un dímero THIQ-THIQ; es decir, en la fórmula (I)  $\text{R}^1$  es de acuerdo con la fórmula (Ia). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIa)



en la que

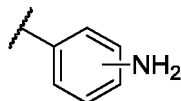
$\text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9, \text{R}^{10}$ , la línea doble  $\text{---}$  y  $\text{X}^2$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

En una realización preferida de acuerdo con la fórmula (IIa), los dímeros THIQ-THIQ se representan por la fórmula (IIa'):



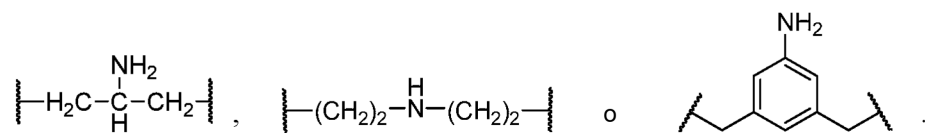
en la que

cada  $\text{R}^9$  es independientemente H, OH, OMe,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NMe}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-8}\text{Me}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  o

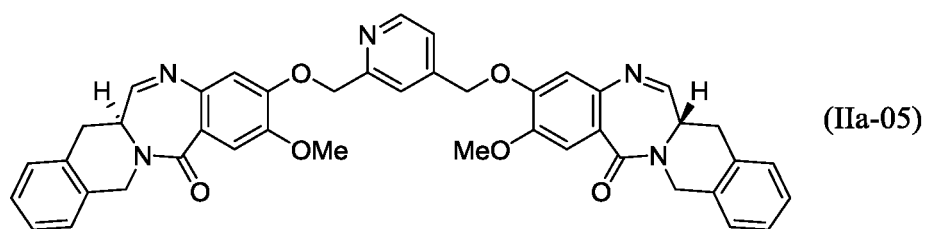
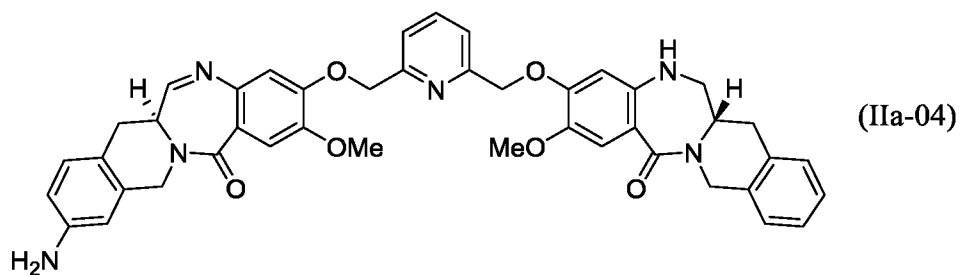
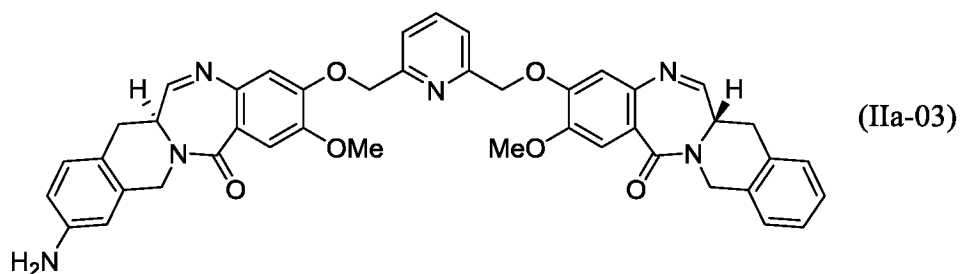
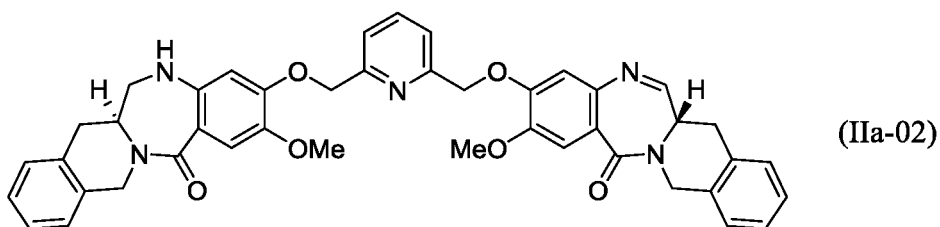
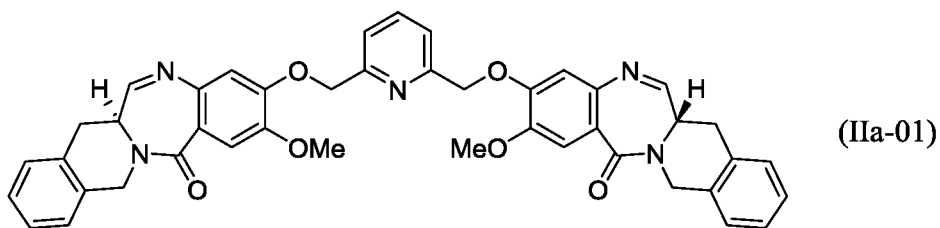


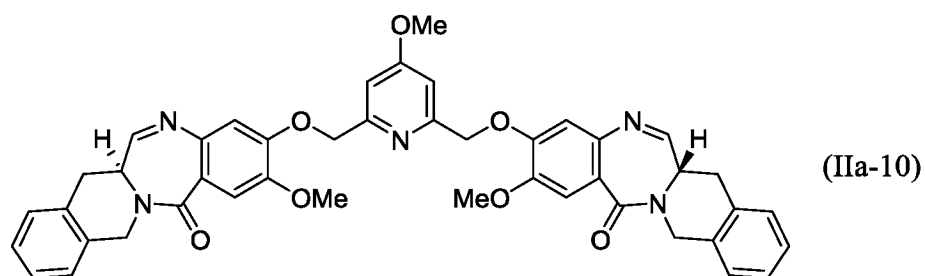
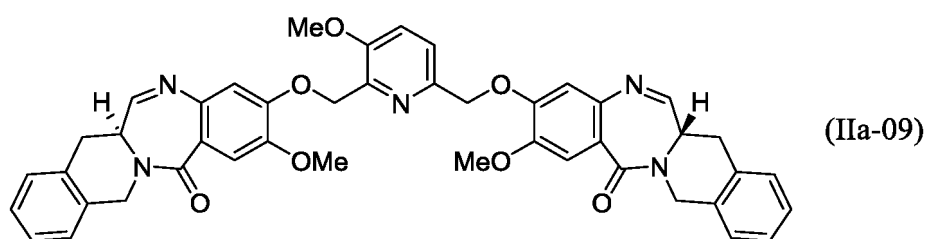
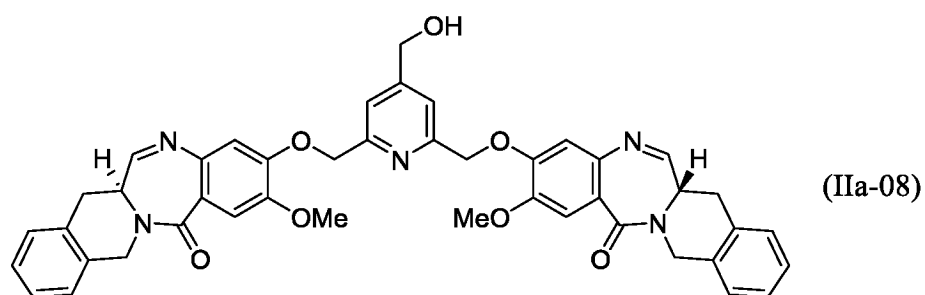
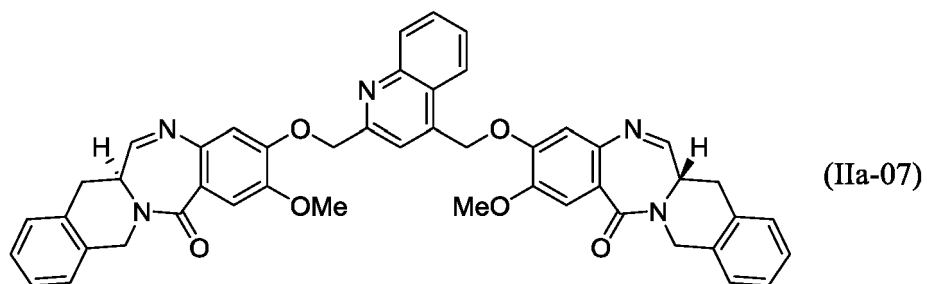
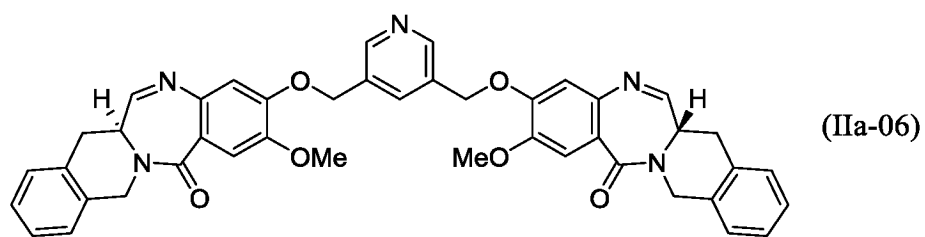
(especialmente el *para*-isómero); y

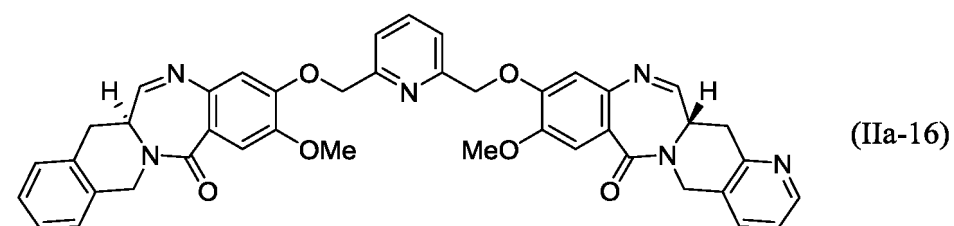
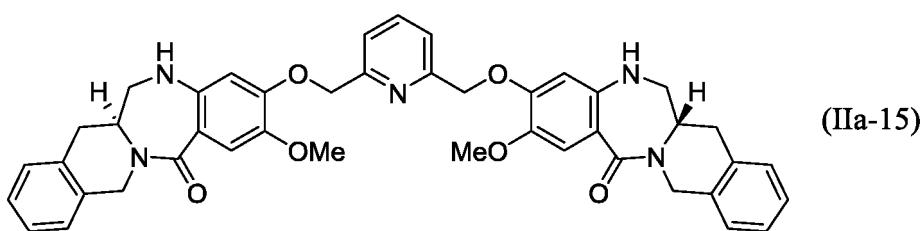
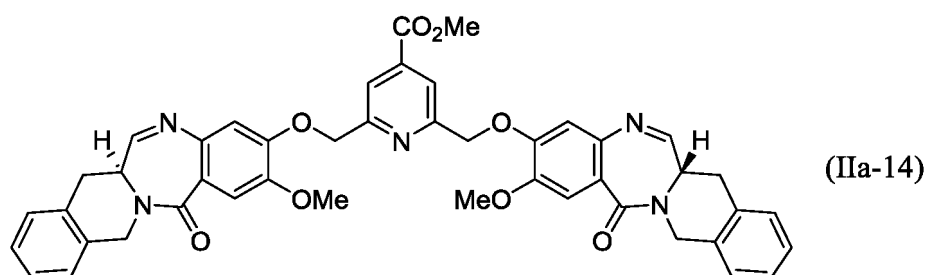
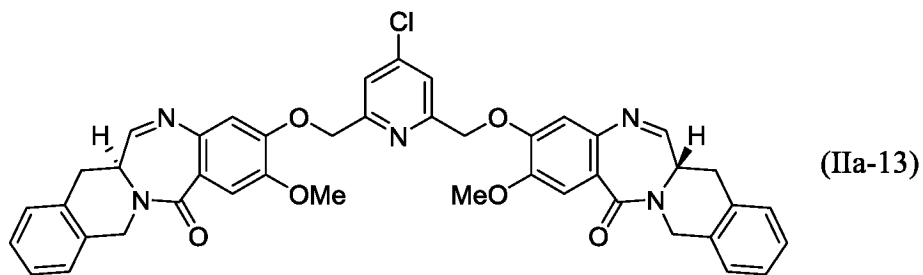
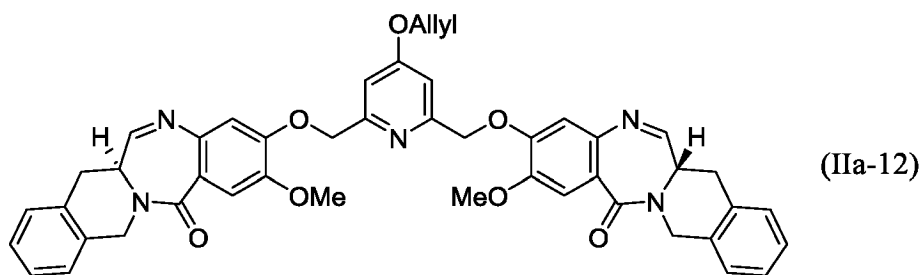
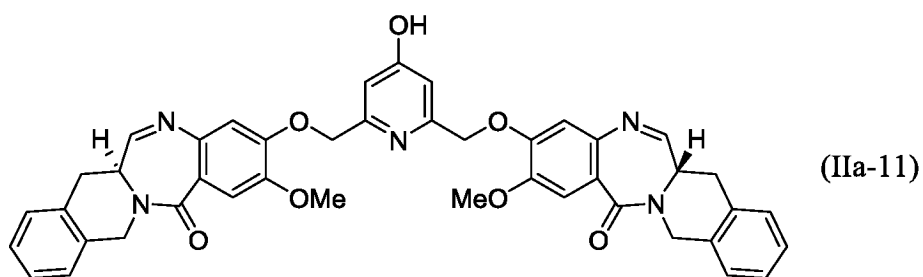
X es  $\text{---}(\text{CH}_2)_3\text{---}$  ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_5\text{---}$  ,  $\text{---}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{---}$  ,  $\text{---}\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{---}$  ,

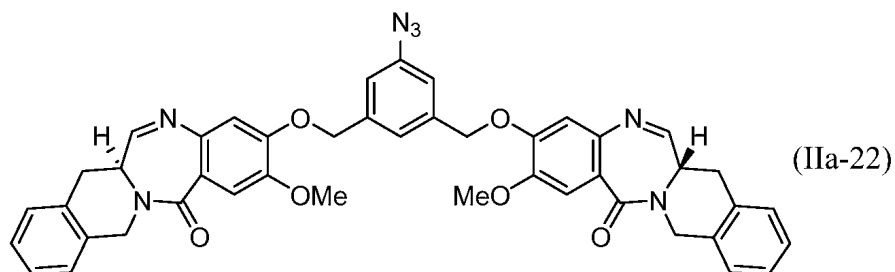
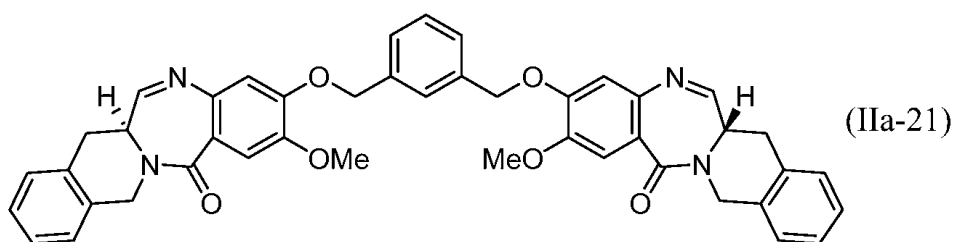
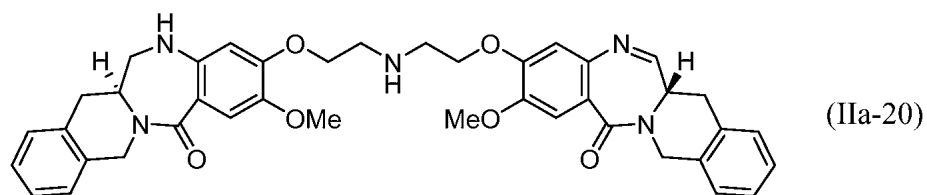
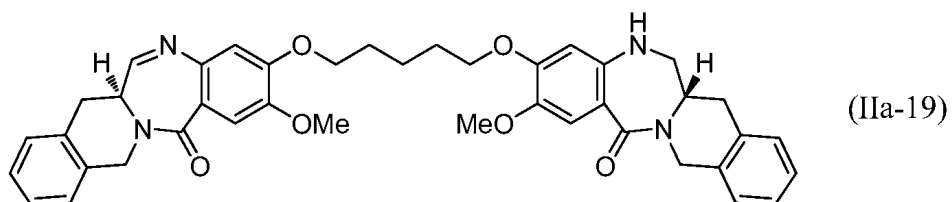
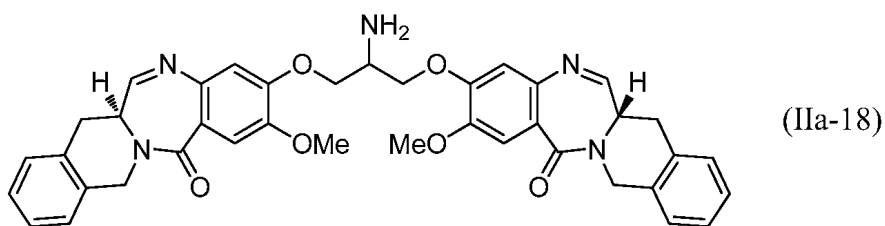
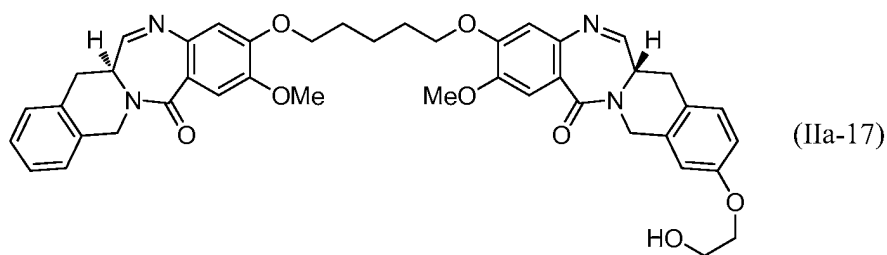


Los ejemplos específicos de dímeros THIQ-THIQ incluyen:



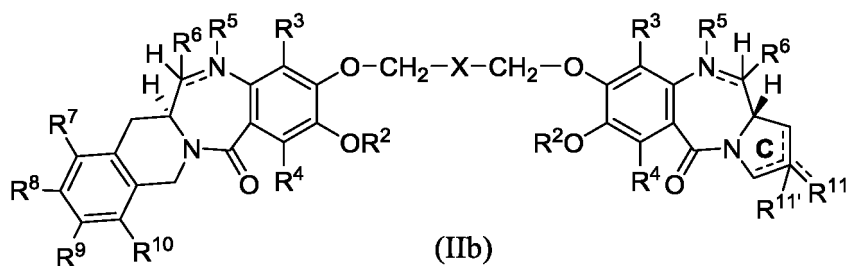






15 Se prefieren especialmente los dímeros THIQ-THIQ (IIa-16) y (IIa-20).

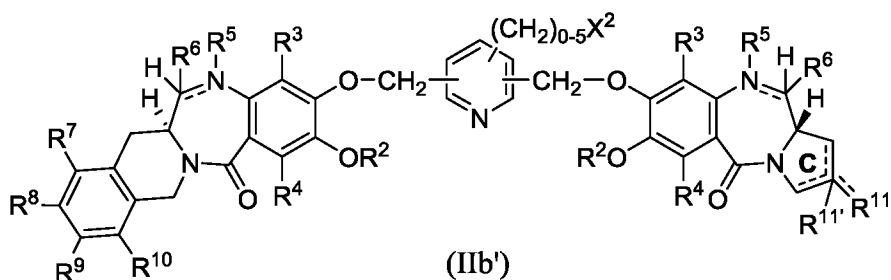
En otra realización, un dímero de la presente invención es un dímero THIQ-PBD; es decir, en la fórmula (I), R<sup>1</sup> es de acuerdo con la fórmula (Ib). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIb):



en la que

5  $R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{11'}$ , la línea doble  $\equiv$ , las líneas de puntos en el anillo C y X son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

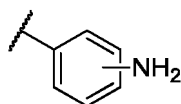
Un dímero THIQ-PBD preferido de acuerdo con la fórmula (IIb) se representa por la fórmula (IIb'):



;

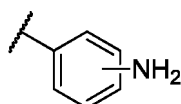
en la que

15  $R^9$  es H, OH, OMe,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ ,  $OCH_2CH_2OH$  o

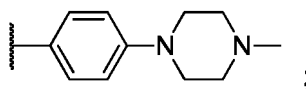


(especialmente el *para*-isómero);

20  $R^{11'}$  es H,  $=CH_2$ ,  $CH=CHMe$ ,  $=CHMe$ ,  $C\equiv CCH_2NH_2$ ,

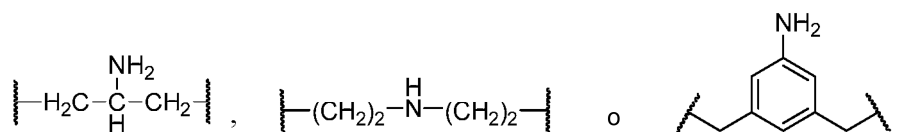
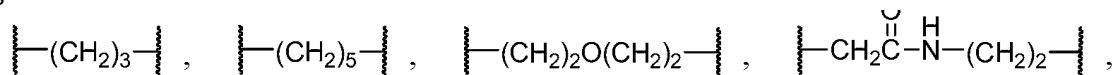


(especialmente el *para*-isómero) o



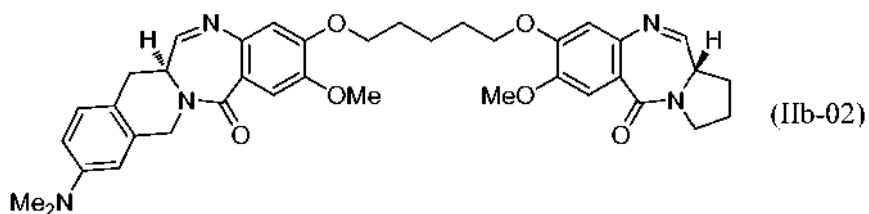
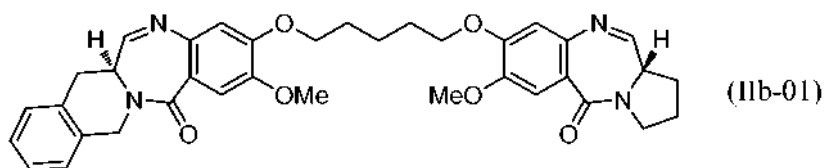
;

y  
X es

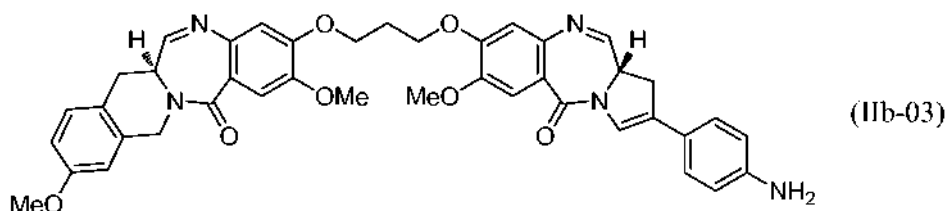


Ejemplos específicos de los dímeros THIQ-PBD incluyen:





y

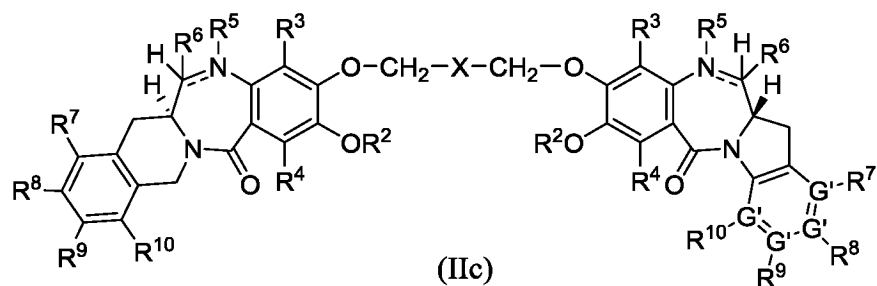


5

Un dímero THIQ-PBD especialmente preferido es (IIb-03).

10

En otra realización, un dímero de la presente invención comprende una unidad de benzodiazepina que tiene un sistema de anillo de THIQ y una unidad de benzodiazepinas que tiene un sistema de anillo de azaindolina (AZI) ("dímero THIQ-AZI"). Un dímero de este tipo puede representarse por la fórmula (IIc):



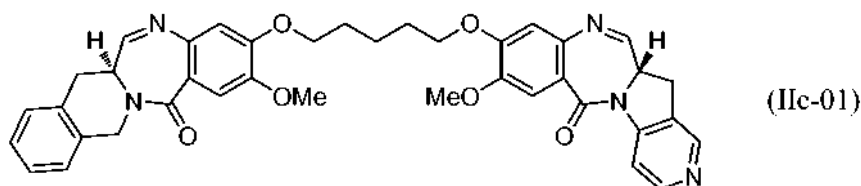
15 en la que

un G' es N y los otros son C;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, la línea doble  $\equiv$  y X son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

20

Un ejemplo de dímero THIQ-AZI es el compuesto (IIc-01):

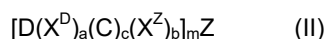


25 CONJUGADOS

### General

Los dímeros de la presente invención pueden usarse como agentes terapéuticos por sí mismos, pero preferentemente se usan como conjugados con un resto de direccionamiento que se une específicamente o preferentemente a una entidad química en una célula cancerosa. Preferentemente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo y la entidad química es un antígeno asociado a tumor.

Por tanto, otra realización de la presente invención es un conjugado que comprende dímero de la presente invención y un ligando, representado por la fórmula (II)



donde Z es un ligando, D es un dímero de la presente invención y  $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$  se denominan colectivamente "resto enlazador" o "enlazador" porque enlazan Z y D. Dentro del enlazador, C es un grupo escindible diseñado para que se escinda en o cerca del sitio de la acción biológica prevista del dímero D;  $X^D$  y  $X^Z$  se denominan restos espaciadores (o "espaciadores") porque separan D y C, y C y Z, respectivamente; los subíndices a, b y c son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de  $X^D$ ,  $X^Z$  y C es opcional). El subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 1, 2, 3 o 4). D,  $X^D$ , C,  $X^Z$  y Z se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

El ligando Z, por ejemplo, un anticuerpo, realiza una función de direccionamiento. Mediante la unión a un tejido o célula diana donde se ubica su antígeno o receptor, el ligando Z se dirige al conjugado allí. (Cuando el ligando Z es un anticuerpo, el conjugado a veces se denomina conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) o inmunoconjugado. Preferentemente, el tejido o célula diana es un tejido canceroso o célula cancerosa y el antígeno o receptor es un antígeno asociado a tumor, es decir, un antígeno que se expresa exclusivamente por las células cancerosas o se sobreexpresa por las células cancerosas, en comparación con las células no cancerosas. La escisión del grupo C en el tejido o célula diana libera el dímero D para que ejerza su efecto citotóxico localmente. En algunos casos, el conjugado se internaliza en una célula diana por endocitosis y la escisión se realiza dentro de la célula diana. De esta manera, se consigue la entrega precisa del dímero D en el sitio de la acción prevista, reduciendo la dosis necesaria. Además, el dímero D normalmente es biológicamente inactivo (o significativamente menos activo) en su estado conjugado, reduciendo de este modo la toxicidad no deseada contra el tejido o las células no diana. Como los fármacos antineoplásicos con frecuencia son altamente tóxicos para las células en general, este es un factor importante a tener en cuenta.

Como se refleja por el subíndice m, cada molécula de ligando Z puede conjugarse con más de un dímero D, dependiendo del número de sitios que el ligando Z tenga disponibles para la conjugación y de las condiciones experimentales que se empleen. Los expertos en la materia apreciarán que, aunque cada molécula individual de ligando Z se conjuga con un número entero de dímeros D, una preparación del conjugado puede analizarse para determinar una relación no entera de dímeros D con respecto al ligando Z, reflejando un promedio estadístico. Esta relación se denomina la relación de sustitución (RS) o, de forma sinónima, la relación fármaco-anticuerpo (RFA).

### Ligando Z

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo. Por comodidad y brevedad y no a modo de limitación, el análisis detallado posterior en el presente documento acerca de la conjugación del ligando Z se escribe en el contexto de que es un anticuerpo, pero los expertos en la materia comprenderán que pueden conjugarse otros tipos de ligando Z, haciendo los cambios necesarios. Por ejemplo, conjugados con ácido fólico ya que el ligando puede dirigirse a las células diana que tienen el receptor de folato en sus superficies (Leamon et al., *Cancer Res.* 2008, 68 (23), 9839). Por la misma razón, el análisis detallado a continuación se escribe principalmente en términos de una relación 1:1 de anticuerpo Z con respecto a análogo D ( $m = 1$ ).

Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumor, lo que permite el direccionamiento selectivo a las células cancerosas. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen: mesotelina, antígeno prostático específico de membrana (APEM), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina cinasa 7 (PTK7), glipicano-3, RG1, fucosil-GM1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. El anticuerpo es preferentemente monoclonal, especialmente un anticuerpo humano monoclonal. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente se desvela en Korman et al., documento US 8.609.816 B2 (2013; B7H4, también conocido como O8E; en particular los anticuerpos 2A7, 1G11 y 2F9); Rao-Naik et al., documento 8.097.703 B2 (2012; CD19; en particular los anticuerpos 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 y 3C10); King et al., documento US 8.481.683 B2 (2013; CD22; en particular los anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6); Keler et al., documento US 7.387.776 B2 (2008; CD30; en particular los anticuerpos 5F11, 2H9 y 17G1); Terrett et al., documento US 8.124.738 B2 (2012; CD70; en particular los anticuerpos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7); Korman et al., documento US 6.984.720 B1 (2006; CTLA-4; en particular los anticuerpos 10D1, 4B6 y 1E2); Vistica et al., documento US 8.383.118 B2 (2013, fucosil-GM1, en particular los anticuerpos 5B1, 5B1a, 7D4, 7E4, 13B8 y 18D5) Korman et al., documento US 8.008.449 B2 (2011; PD-1; en particular los

- anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4); Huang et al., documento US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, en particular los anticuerpos 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli et al., documento US 7.875.278 B2 (2011; PSMA; en particular los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3); Terrett et al., documento US 8.222.375 B2 (2012; PTK7; en particular los anticuerpos 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a y 7C8); Terrett et al., documento US 8.680.247 B2 (2014; glipicano-3; en particular los anticuerpos 4A6, 11E7 y 16D10); Harkins et al., documento US 7.335.748 B2 (2008; RG1; en particular los anticuerpos A, B, C y D); Terrett et al., documento US 8.268.970 B2 (2012; mesotelina; en particular los anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1); Xu et al., documento US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; en particular los anticuerpos 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 y 1A9.A6.B9); Deshpande et al., documento US 8.258.266 B2 (2012; IP10; en particular los anticuerpos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S y 13C4); Kuhne et al., documento US 8.450.464 B2 (2013; CXCR4; en particular los anticuerpos F7, F9, D1 y E2); y Korman et al., documento US 7.943.743 B2 (2011; PD-L1; en particular los anticuerpos 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4). Cada uno de los anticuerpos anteriormente mencionados puede usarse en un CAF con un dímero de la presente invención.
- 15 El ligando Z también puede ser un fragmento de anticuerpo o un mimético de anticuerpo, tal como un Affibody, un anticuerpo de dominio (dAb), un nanocuerpo, un unicuerpo, una DARPin, una anticalina, un versacuerpo, una duocalina, una lipocalina o un avímero.
- 20 Uno cualquiera de varios grupos reactivos diferentes en el ligando Z puede ser un sitio de conjugación, incluyendo grupos  $\epsilon$ -amino en restos de lisina, restos de hidrato de carbono colgantes, grupos ácido carboxílico, grupos disulfuro y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa una contraposición, que tiene algunas ventajas y algunas desventajas. Para obtener revisiones sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para la conjugación, véase, por ejemplo, Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001), 171-216 y Dubowchik y Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123.
- 25 En una realización, el ligando Z se conjuga a través de un grupo  $\epsilon$ -amino de lisina. La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, que pueden conjugarse a través de enlaces amida, urea, tiourea o carbamato usando técnicas conocidas en la materia. Sin embargo, es difícil controlar qué grupos  $\epsilon$ -amino y cuántos reaccionan, lo que conduce a una variabilidad potencial de lote a lote en las preparaciones de conjugados. Además,
- 30 la conjugación puede provocar la neutralización de un grupo  $\epsilon$ -amino protonado importante para mantener la conformación nativa del anticuerpo o puede tener lugar en una lisina cercana o en el sitio de unión a antígeno, lo que no es deseable.
- 35 En otra realización, el ligando Z puede conjugarse a través de una cadena lateral de hidrato de carbono, ya que muchos anticuerpos están glucosilados. La cadena lateral de hidrato de carbono puede oxidarse con peryodato para generar grupos aldehído, que a su vez pueden hacerse reaccionar con aminas para formar un grupo imina, tal como en una semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina puede convertirse en un grupo amina más estable mediante reducción con cianoborohidruro sódico. Para obtener divulgaciones adicionales acerca de la conjugación a través de cadenas laterales de hidrato de carbono, véase, por ejemplo, Rodwell et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83, 2632-2636 (1986). Al igual que con los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, existen preocupaciones con respecto a la reproducibilidad de la ubicación del sitio o sitios de conjugación y la estequiometría.
- 40 En otra realización más, el ligando Z puede conjugarse a través de un grupo ácido carboxílico. En una realización, un grupo ácido carboxílico terminal se funcionaliza para generar una carbohidrazida, que después se hace reaccionar con un resto de conjugación que lleva aldehído. Véase Fisch et al., *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 147-153.
- 45 En otra realización más, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de un grupo disulfuro que une un resto cisteína en el anticuerpo Z y un azufre en la otra porción del conjugado. Algunos anticuerpos carecen de grupos tiol (sulfhidrilo) libres pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo, en la región bisagra. En dicho caso, pueden generarse grupos tiol libres mediante la reducción de grupos disulfuro nativos. Los grupos tiol generados de este modo pueden usarse para la conjugación. Véase, por ejemplo, Packard et al., *Biochemistry* 1986, 25, 3548-3552; King et al., *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994); y Doronina et al., *Nature Biotechnol.* 21 (7), 778-784 (2003). Nuevamente, existen preocupaciones con respecto a la ubicación del sitio de conjugación y la estequiometría y la posible
- 50 alteración de la conformación nativa del anticuerpo.
- 55 Se conocen varios métodos para introducir grupos tiol libres en anticuerpos sin romper los enlaces disulfuro nativos, métodos que pueden ponerse en práctica con un ligando Z de la presente invención. Dependiendo del método empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfhidrilos libres en ubicaciones predeterminadas.
- 60 En un enfoque, se preparan anticuerpos mutados en los que una cisteína se sustituye por otro aminoácido. Véase, por ejemplo, Eigenbrot et al., documento US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti et al., *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507; Urnovitz et al., documento US 4.698.420 (1987); Stimmel et al., *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam et al., documento US 7.311.902 B2 (2007); Kuan et al., *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon et al., *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995). En otro enfoque, se añade una cisteína adicional al extremo C terminal.
- 65 Véase, por ejemplo, Cumber et al., *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992); King et al., *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994); Li et al., *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002); Yang et al., *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003); y Olafson et

al., *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004). Liu et al. enseña un método preferido para introducir cisteínas libres, el documento WO 2009/026274 A1, en el que se añade una secuencia de aminoácidos que lleva cisteína al extremo C terminal de la cadena pesada de un anticuerpo. Este método introduce un número conocido de restos de cisteína (uno por cadena pesada) en una ubicación distante del sitio de unión a antígeno.

En otra realización más, los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina pueden modificarse con reactivos tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), convirtiendo un grupo  $\epsilon$ -amino en un grupo tiol o disulfuro, creando un sustituto de cisteína, por así decirlo. Sin embargo, este método tiene las mismas limitaciones de ubicación de conjugación y de estequiometría asociadas a los grupos  $\epsilon$ -amino propiamente dichos.

#### Componentes enlazadores

Como se ha indicado anteriormente, la porción enlazadora de un conjugado de la presente invención comprende hasta tres elementos: un grupo escindible C y separadores opcionales  $X^Z$  y  $X^D$ .

El grupo escindible C es un grupo escindible en condiciones fisiológicas, seleccionado preferentemente de manera que sea relativamente estable mientras el conjugado esté en la circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinda fácilmente una vez que el conjugado alcance su sitio de la acción prevista, es decir, cerca, en o dentro de la célula diana. Preferentemente, el conjugado es internalizado por una célula diana tras la unión del anticuerpo Z a un antígeno presentado en la superficie de la célula diana. Posteriormente, la escisión del grupo C se produce en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

En una realización, el grupo C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo está ligeramente por encima de neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, de aproximadamente 5. Por tanto, un grupo C cuya escisión es catalizada por ácido se escindirán a una velocidad varios órdenes de magnitud más rápida dentro de un lisosoma que la velocidad en el plasma sanguíneo. Los ejemplos de grupos sensibles al ácido adecuados incluyen cis-aconitilamidas e hidrazonas, como se describe en Shen et al., documento US 4.631.190 (1986); Shen et al., documento US 5.144.011 (1992); Shen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) e Yang et al., *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988).

En otra realización, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros pueden escindirarse mediante un mecanismo de intercambio de tiol-disulfuro, a una velocidad que depende de la concentración de tiol ambiental. Como la concentración intracelular de glutatión y otros tioles es superior a sus concentraciones séricas, la velocidad de escisión de un disulfuro será mayor intracelularmente. Adicionalmente, la velocidad de intercambio de tiol-disulfuro puede modularse mediante el ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un alquil-aril disulfuro frente a un alquil-alquil disulfuro; sustitución en el anillo de arilo, etc.), permitiendo el diseño de enlaces disulfuro que tienen una estabilidad en suero potenciada o una velocidad de escisión particular. Para obtener divulgaciones adicionales relacionadas con grupos disulfuro escindibles en conjugados, véase, por ejemplo, Thorpe et al., *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi et al., documento US 7.541.530 B2 (2009); Ng et al., documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., documento WO 2002/096910 A1; Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; y Sufi et al., documento US 2010/0145 036 A1.

Un grupo escindible preferido es un péptido que es escindido selectivamente por una proteasa dentro de la célula diana, a diferencia de una proteasa en el suero. Normalmente, un grupo peptídico escindible comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente de 1 a 6 aminoácidos, más preferentemente de 1 a 3 aminoácidos. El aminoácido o aminoácidos pueden ser  $\alpha$ -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos derivados de los mismos, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. En este contexto, el término "aminoácido" también incluye análogos y miméticos de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general  $H_2N(R)CHCO_2H$  de un aminoácido natural, excepto porque el grupo R no es uno que se encuentra entre los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina metil sulfonio. Un mimético de aminoácido es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un  $\alpha$ -aminoácido pero funciona de manera similar a uno. El aminoácido puede tener la estereoquímica "L" de los aminoácidos codificados genéticamente, así como la estereoquímica enantiomérica "D".

Preferentemente, el grupo C contiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa. Se conocen en la técnica muchas secuencias de reconocimiento de escisión. Véase, por ejemplo, Matayoshi et al. *Science* 247: 954 (1990); Dunn et al. *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah et al. *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber et al. *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith et al. *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); y Bouvier et al. *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995).

Para los conjugados que no tienen por objeto ser internalizados por una célula, puede elegirse un grupo C de manera que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular en la vecindad del tejido diana, por ejemplo, una proteasa liberada por células próximas a morir cercanas o una proteasa asociada a tumor. Son ejemplos de proteasas extracelulares asociadas a tumor son metaloproteasas de matriz (MMP), oligopeptidasa thimet (TOP) y CD10.

Para los conjugados que se diseñan para ser internalizados por una célula, el grupo C comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosómica o lisosómica, especialmente la última. Los ejemplos no limitantes de dichas proteasas incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente catepsina B. La catepsina B escinde preferentemente péptidos en una secuencia -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- donde AA<sup>1</sup> es un aminoácido básico o de enlace de hidrógeno fuerte (tal como lisina, arginina o citrulina) y AA<sup>2</sup> es un aminoácido hidrófobo (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina), por ejemplo, Val-Cit (donde Cit denota citrulina) o Val-Lys. (En el presente documento, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección de N a C, como en H<sub>2</sub>N-AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>-CO<sub>2</sub>H, a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit y Asp-Val-Cit también son motivos peptídicos de sustrato para la catepsina B, aunque en algunos casos la tasa de escisión puede ser más lenta. Para obtener información adicional acerca de los grupos escindibles con catepsina, véase Dubowchik et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002). Otra enzima que puede utilizarse para escindir enlazadores peptídicos es la legumaina, una cisteína proteasa lisosómica que escinde preferentemente en Ala-Ala-Asn.

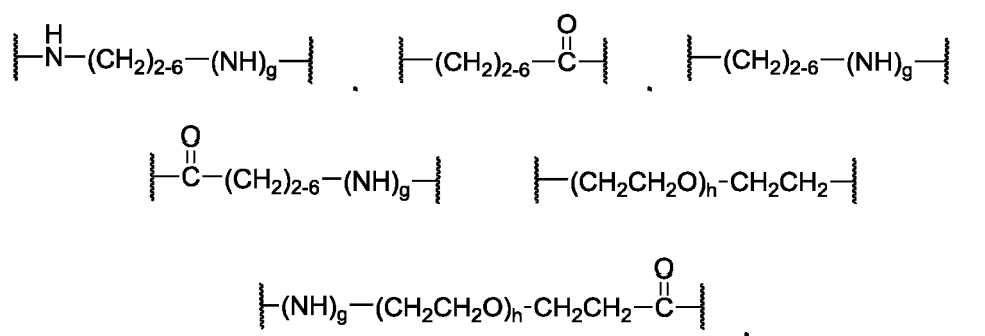
En una realización, el Grupo C es un péptido que comprende una secuencia de dos aminoácidos -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- en la que AA<sup>1</sup> es lisina, arginina o citrulina y AA<sup>2</sup> es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra realización, C consiste en una secuencia de uno a tres aminoácidos, seleccionados entre el grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser y Glu.

La preparación y el diseño de grupos escindibles C que consisten en un solo aminoácido se desvelan en Chen et al., documento US 8.664.407 B2 (2014).

El grupo C también puede ser fotoescindible, por ejemplo, un nitrobenzil éter que se escinde tras la exposición a la luz.

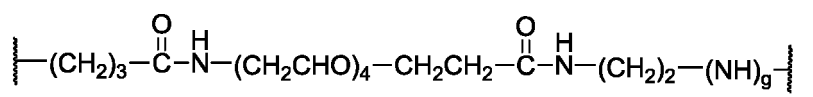
El grupo C puede unirse directamente al anticuerpo Z o el análogo D; es decir, los espaciadores X<sup>Z</sup> y X<sup>D</sup>, según el caso, pueden estar ausentes. Por ejemplo, si el grupo C es un disulfuro, uno de los dos azufres puede ser un resto cisteína o su sustituto en el anticuerpo Z. O, el grupo C puede ser una hidrazona unida a un aldehído en una cadena lateral de hidrato de carbono del anticuerpo. O, el grupo C puede ser un enlace peptídico formado con un grupo ε-amino de lisina del anticuerpo Z. En una realización preferida, el dímero D se une directamente al grupo C a través de un enlace peptídico a un grupo carboxilo o amina en el dímero D.

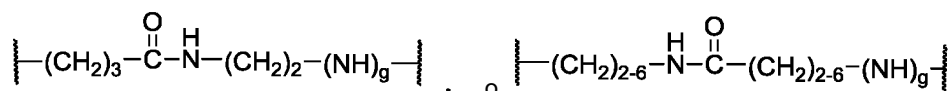
Cuando está presente, el espaciador X<sup>Z</sup> proporciona una separación espacial entre el grupo C y el anticuerpo Z, para que el primero no interfiera estéricamente con la unión del antígeno por este último o que este último no interfiera estéricamente con la escisión del primero. Adicionalmente, el espaciador X<sup>Z</sup> puede usarse para conferir una solubilidad aumentada o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X<sup>Z</sup> puede comprender uno o más segmentos modulares, que pueden ensamblarse en cualquier número de combinaciones. Son ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X<sup>Z</sup>:



y combinaciones de los mismos,

donde el subíndice g es 0 o 1 y el subíndice h es de 1 a 24, preferentemente de 2 a 4. Estos segmentos pueden combinarse, tal como se ilustra a continuación:





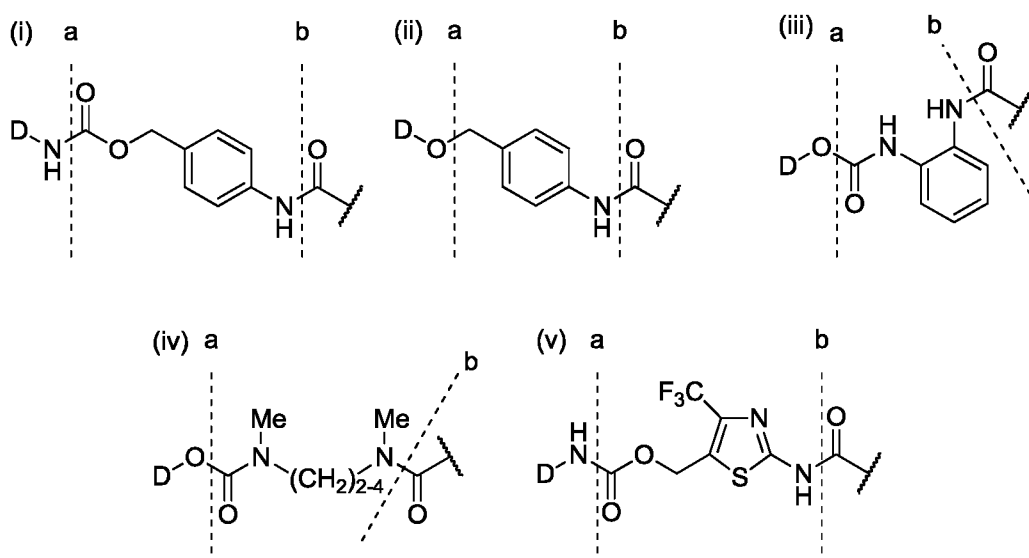
El espaciador  $X^D$ , si está presente, proporciona una separación espacial entre el grupo C y el dímero D, para que este último no interfiera estérica o electrónicamente con la escisión del primero. El espaciador  $X^D$  también puede servir para introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en un conjugado. Generalmente, la masa y funcionalidad adicionales afectarán a la semivida en suero y otras propiedades del conjugado. Por tanto, a través de una selección con buen criterio de grupos espaciadores, puede modularse la semivida en suero de un conjugado. El espaciador  $X^D$  también puede ensamblarse a partir de segmentos modulares, como se ha descrito anteriormente en el contexto del espaciador  $X^Z$ .

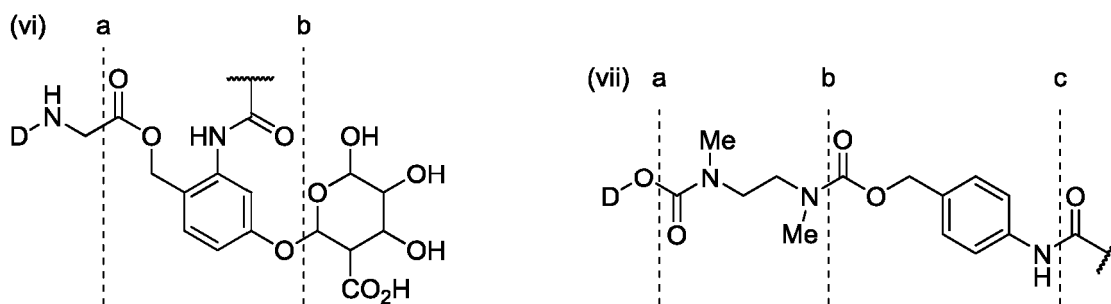
Los espaciadores  $X^Z$  y/o  $X^D$ , cuando están presentes, proporcionan preferentemente una separación lineal de 4 a 25 átomos, más preferentemente de 4 a 20 átomos, entre Z y C o D y C, respectivamente.

El enlazador puede realizar otras funciones además de unir covalentemente el anticuerpo y el fármaco. Por ejemplo, el enlazador puede contener grupos poli(etilenglicol) (PEG), que potencian la solubilidad ya sea durante la realización de la química de conjugación o en el producto CAF final. Cuando hay presente un grupo PEG, puede incorporarse en el espaciador  $X^Z$  de  $X^D$  o en ambos. El número de unidades de repetición en un grupo PEG puede ser de 2 a 20, preferentemente de entre 4 y 10.

El espaciador  $X^Z$  o  $X^D$ , o ambos, pueden comprender un resto autoinmolante. Un resto autoinmolante es un resto que (1) está unido al grupo C y ya sea el anticuerpo Z o el dímero D y (2) tiene una estructura de manera que la escisión del grupo C inicie una secuencia de reacción que dé como resultado que el resto autoinmolante se desuna del anticuerpo Z o el dímero D, según el caso. En otras palabras, la reacción en un sitio distal del anticuerpo Z o el dímero D (escisión del grupo C) provoca que el enlace  $X^Z$ -Z o  $X^D$ -D también se rompa. La presencia de un resto autoinmolante es deseable en el caso del espaciador  $X^D$  porque, si, después de la escisión del conjugado, el espaciador  $X^D$  o una porción del mismo permaneciera unido al dímero D, la actividad biológica de este último podría verse alterada. El uso de un resto autoinmolante es especialmente deseable cuando el grupo escindible C es un polipéptido, en cuyo caso el resto autoinmolante normalmente se ubica adyacente al mismo.

A continuación se muestran restos autoinmolantes (i)-(v) de ejemplo unidos a un grupo hidroxilo o amino en una molécula D compañera:



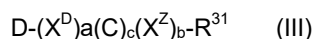


El resto autoinmolante es la estructura entre las líneas de puntos a y b (o las líneas de puntos b y c), con características estructurales adyacentes que se muestran para proporcionar contexto. Los restos autoinmolantes (i) y (v) están unidos a un dímero D-NH<sub>2</sub> (es decir, el dímero D se conjuga a través de un grupo amino), mientras que los restos autoinmolantes (ii), (iii) y (iv) están unidos a un dímero D-OH (es decir, el dímero D se conjuga a través de un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace de amida en la línea de puntos b (por ejemplo, por una peptidasa) libera el nitrógeno de amida como nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacción que da como resultado la escisión del enlace en la línea de puntos a y la consiguiente liberación de D-OH o D-NH<sub>2</sub>, según el caso. Como alternativa, la escisión que desencadena la reacción de autoinmolación puede ser por un tipo diferente de enzima, por ejemplo, por una β-glucuronidasa, como en el caso de la estructura (vi). En algunos casos, los grupos autoinmolantes pueden usarse en tándem, como se muestra en la estructura (vii). En dicho caso, la escisión en la línea de puntos c desencadena la autoinmolación del resto entre las líneas de puntos b y c mediante una reacción de eliminación 1,6, seguida de la autoinmolación del resto entre las líneas de puntos a y b mediante una reacción de ciclación-eliminación. Para obtener divulgaciones adicionales con respecto a restos autoinmolantes, véase Carl et al., *J. Med. Chem.*, 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., documento WO 81/01145 (1981); Dubowchik et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999); Firestone et al., documento US 6.214.345 B1 (2001); Toki et al., *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002); Doronina et al., *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (fe de erratas, p. 941); Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Sufi et al., documento WO 2008/083312 A2; Feng, documento US 7.375.078 B2; Jeffrey et al., documento US 8.039.273; y Senter et al., documento US 2003/0096743 A1. Un grupo autoinmolante preferido es el grupo p-aminobencil oxycarbonilo (PABC), como se muestra en la estructura (i).

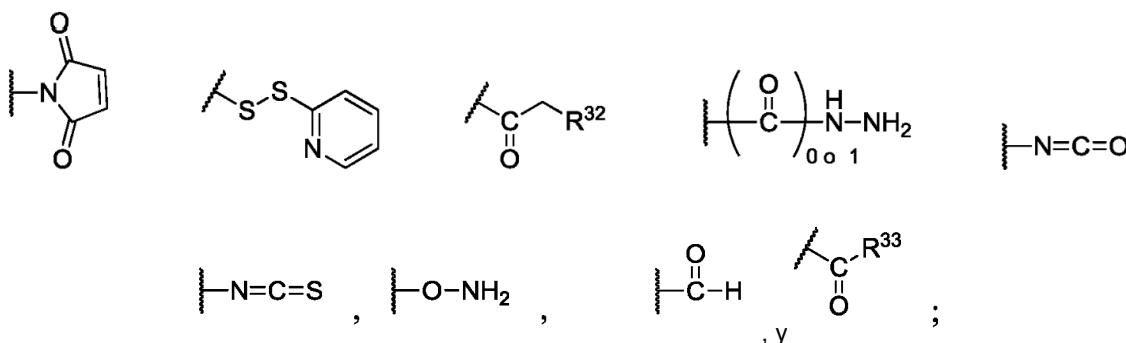
En otra realización, un resto de direccionamiento de anticuerpo y el dímero D se unen mediante un enlazador no escindible, es decir, el elemento C está ausente. La degradación del anticuerpo en última instancia reduce el enlazador a un pequeño resto adjunto que no interfiere con la actividad biológica del dímero D.

#### Técnicas de conjugación

Los conjugados de la presente invención se preparan preferentemente preparando en primer lugar un compuesto que comprende un análogo de la presente invención (representado por D en las fórmulas a continuación) y un enlazador (X<sup>D</sup>)<sub>a</sub>(C)<sub>c</sub>(X<sup>Z</sup>)<sub>b</sub> (donde X<sup>D</sup>, C, X<sup>Z</sup>, a, b y c son como se definen para la fórmula (II)) para formar una composición análogo-enlazador representada por la fórmula (III):



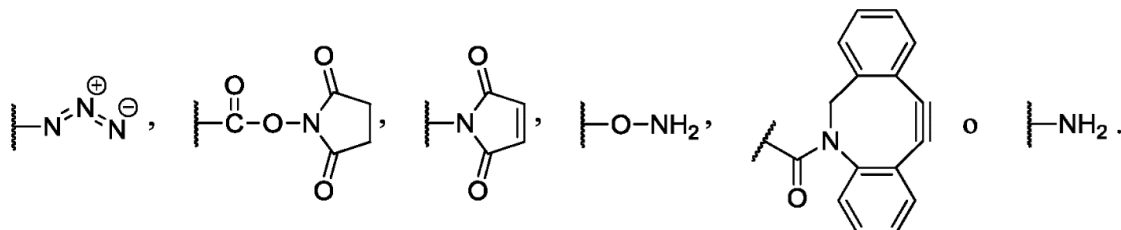
donde R<sup>31</sup> es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo Z para formar el conjugado. Los ejemplos de grupos R<sup>31</sup> adecuados incluyen amino, azida, ciclooctino,



donde R<sup>32</sup> es Cl, Br, F, mesilato o tosilato y R<sup>33</sup> es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimido, -O-(4-nitrofenilo), -O-

pentafluorofenilo u -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente utilizable para la preparación de restos adecuados  $D-(X^D)_aC(X^Z)_bR^{31}$  se desvela en Ng et al., documento US 7.087.600 B2 (2006); Ng et al., documento US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., documento US 7.129.261 B2 (2006); Ng et al., documento WO 02/096910 A1; Boyd et al., documento US 7.691.962 B2; Chen et al., documento US 7.517.903 B2 (2009); Gangwar et al., documento US 7.714.016 B2 (2010); Boyd et al., documento US 2008/0279868 A1; Gangwar et al., documento US 7.847.105 B2 (2010); Gangwar et al., documento US 7.968.586 B2 (2011); Sufi et al., documento US 2010/0145036 A1; y Chen et al., documento US 2010/0113476 A1.

Preferentemente, el grupo funcional reactivo  $-R^{31}$  es  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SH$ , maleimido, ciclooctino, azido ( $-N_3$ ), hidroxilamino ( $-ONH_2$ ) o N-hidroxisuccinimido. Son grupos funcionales especialmente preferidos  $-R^{31}$ :



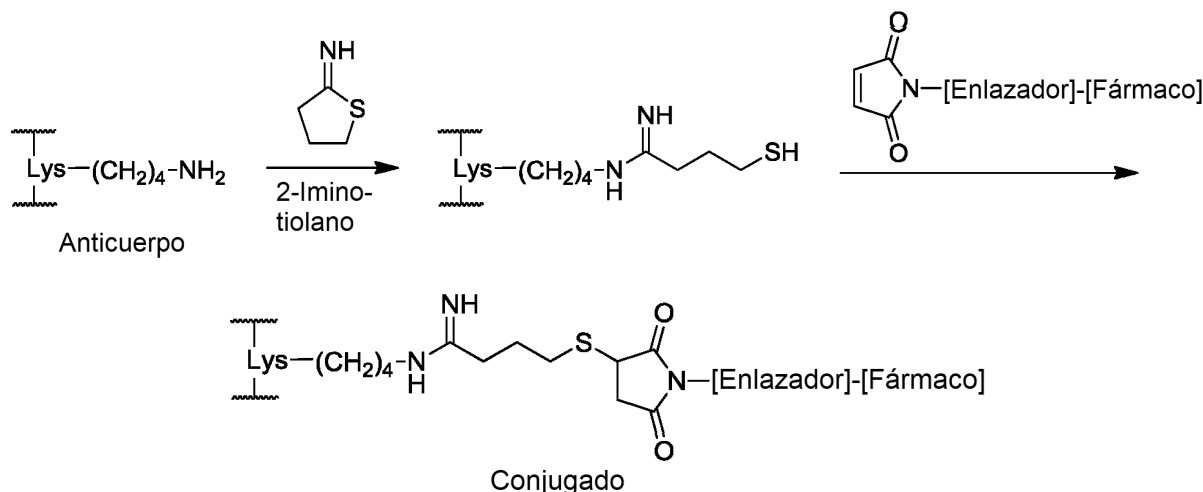
Un grupo  $-OH$  puede esterificarse con un grupo carboxi en el anticuerpo, por ejemplo, en una cadena lateral de ácido aspártico o glutámico.

Un grupo  $-CO_2H$  puede esterificarse con un grupo  $-OH$  o amidarse con un grupo amino (por ejemplo, en una cadena lateral de lisina) en el anticuerpo.

Un grupo N-hidroxisuccinimida es funcionalmente un grupo carboxilo activado y puede amidarse convenientemente por reacción con un grupo amino (por ejemplo, de lisina).

Un grupo maleimida puede conjugarse con un grupo  $-SH$  en el anticuerpo (por ejemplo, de cisteína o de la modificación química del anticuerpo para introducir un grupo funcional sulfhidrido), en una reacción de adición de Michael.

Diversas técnicas pueden introducir un grupo  $-SH$  en un anticuerpo. En una preferida, un grupo  $\epsilon$ -amino en la cadena lateral de un resto de lisina en el anticuerpo se hace reaccionar con 2-iminotiolano para introducir un grupo tiol libre ( $-SH$ ). El grupo tiol puede reaccionar con una maleimida u otro grupo aceptor de nucleófilos para efectuar la conjugación:



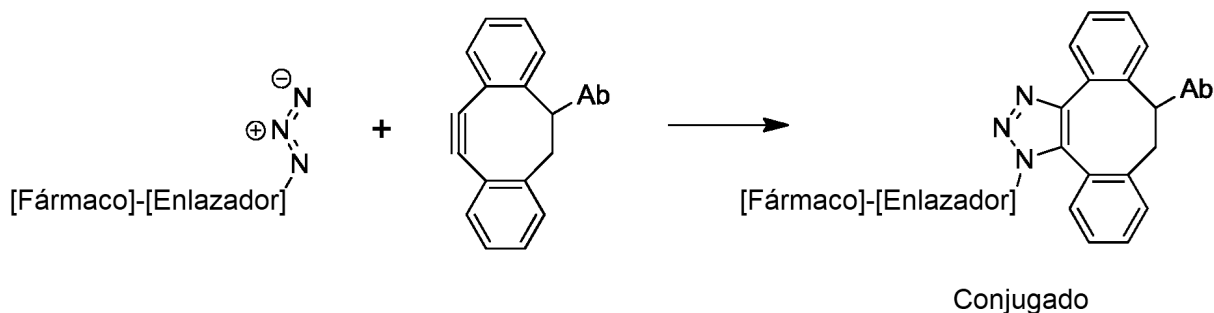
Normalmente, se consigue un nivel de tiolación de dos a tres tioles por anticuerpo. Para obtener un procedimiento representativo, véase Cong *et al.* 2014. Por tanto, en una realización, un anticuerpo para la conjugación con un dímero de la presente invención tiene uno o más restos lisina (preferentemente dos o tres) modificados por reacción con iminotiolano.

También puede usarse un grupo  $-SH$  para la conjugación donde el anticuerpo se ha modificado para introducir un grupo maleimida al mismo, en una reacción de adición de Michael que es la "imagen espejular" de la descrita anteriormente. Los anticuerpos pueden modificarse para que tengan grupos maleimida con N-succinimidil 4-



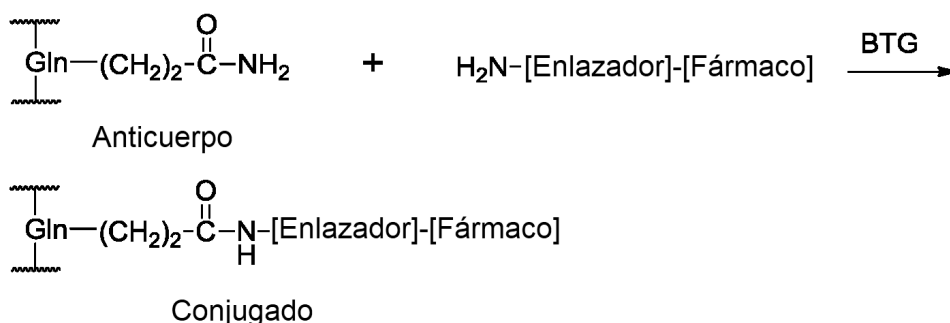
(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato (SMCC) o su variante sulfonada sulfo-SMCC, estando ambos reactivos disponibles en Sigma-Aldrich.

Una técnica de conjugación alternativa emplea una "química clic" sin cobre, en la que un grupo azida se añade a través del enlace alquino tenso de un ciclooctino para formar un anillo de 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 2004, 126, 15046; Best, *Biochemistry* 2009, 48, 6571. La azida puede ubicarse en el anticuerpo y el ciclooctino en el resto farmacológico, o viceversa. Un grupo ciclooctino preferido es dibenzociclooctino (DIBO). Diversos reactivos que tienen un grupo DIBO están disponibles en Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón. La reacción a continuación ilustra la conjugación por química clic para el caso en el que el grupo DIBO está unido al anticuerpo (Ab):



Otra técnica más de conjugación implica la introducción de un aminoácido no natural en un anticuerpo, proporcionando el aminoácido no natural un grupo funcional para la conjugación con un grupo funcional reactivo en el resto farmacológico. Por ejemplo, el aminoácido no natural p-acetilfenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido, como se enseña en Tian et al., documento WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en la p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación a través de la formación de una oxima con un grupo hidroxilamino en el resto enlazador-fármaco. Como alternativa, el aminoácido no natural p-azidofenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo para proporcionar un grupo funcional azida para la conjugación a través de química clic, como se ha analizado anteriormente. Los aminoácidos no naturales también pueden incorporarse en un anticuerpo u otro polipéptido usando métodos sin células, como se enseña en Goerke et al., documento US 2010/0093024 A1 (2010) y Goerke et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102 (2), 400-416. Por tanto, en una realización, un anticuerpo que se usa para preparar un conjugado con un dímero de la presente invención tiene uno o más aminoácidos reemplazados por un aminoácido no natural, que preferentemente es p-acetilfenilalanina o p-azidofenilalanina, más preferentemente p-acetilfenilalanina.

Otra técnica de conjugación más usa la enzima transglutaminasa (preferentemente transglutaminasa bacteriana o BTG), según Jeger et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995. BTG forma un enlace amida entre la cadena lateral carboxamida de una glutamina (el aceptor de amina) y un grupo alquilenamino (el donador de amina), que puede ser, por ejemplo, el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina o un grupo 5-amino-n-pentilo. En una reacción de conjugación habitual, el resto glutamina se ubica en el anticuerpo, mientras que el grupo alquilenamino se ubica en el resto enlazador-fármaco, como se muestra a continuación:



El posicionamiento de un resto glutamina en una cadena polipeptídica tiene un gran efecto sobre su susceptibilidad a transamidación mediada por BTG. Ninguno de los restos glutamina en un anticuerpo es normalmente sustrato de BTG. Sin embargo, si el anticuerpo se desglucosila (siendo el sitio de glucosilación la asparagina 297 (N297)) la glutamina 295 (Q295) cercana se vuelve susceptible a BTG. Un anticuerpo puede desglucosilarse enzimáticamente mediante tratamiento con PNGasa F (Péptido-N-Glucosidasa F). Como alternativa, un anticuerpo puede sintetizarse sin glucósidos mediante la introducción de una mutación N297A en la región constante, para eliminar el sitio de glucosilación N297. Además, se ha demostrado que una sustitución de N297Q en un anticuerpo no solo elimina la glucosilación, sino que también introduce un segundo resto glutamina (en la posición 297) que también es un

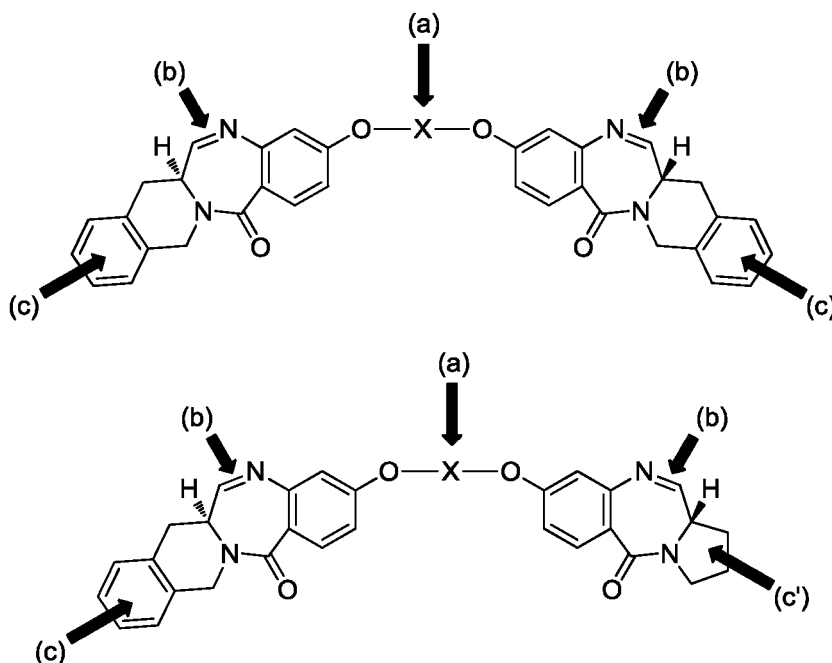
aceptor de amina. Por tanto, en una realización, un anticuerpo que se conjuga con un dímero de la presente invención se desglucosila. En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución N297Q. Los expertos en la materia apreciarán que la desglucosilación por modificación posterior a la síntesis o por la introducción de una mutación N297A genera dos restos glutamina reactivos con BTG por anticuerpo (uno por cadena pesada, en la posición 295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro restos glutamina reactivos con BTG (dos por cadena pesada, en las posiciones 295 y 297).

La conjugación también puede efectuarse usando la enzima Sortasa A, como se enseña en Levary et al., *PLoS One* 2011, 6 (4), e18342; Proft, *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 1-10; Ploegh et al., documento WO 2010/087994 A2 (2010); y Mao et al., documento WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de la Sortasa A (normalmente LPXTG, donde X es cualquier aminoácido natural) puede estar ubicado en el ligando Z y el motivo aceptor nucleófilo (normalmente GGG) puede ser el grupo R<sup>31</sup> en la fórmula (III) o viceversa.

#### Compuestos dímero-enlazador

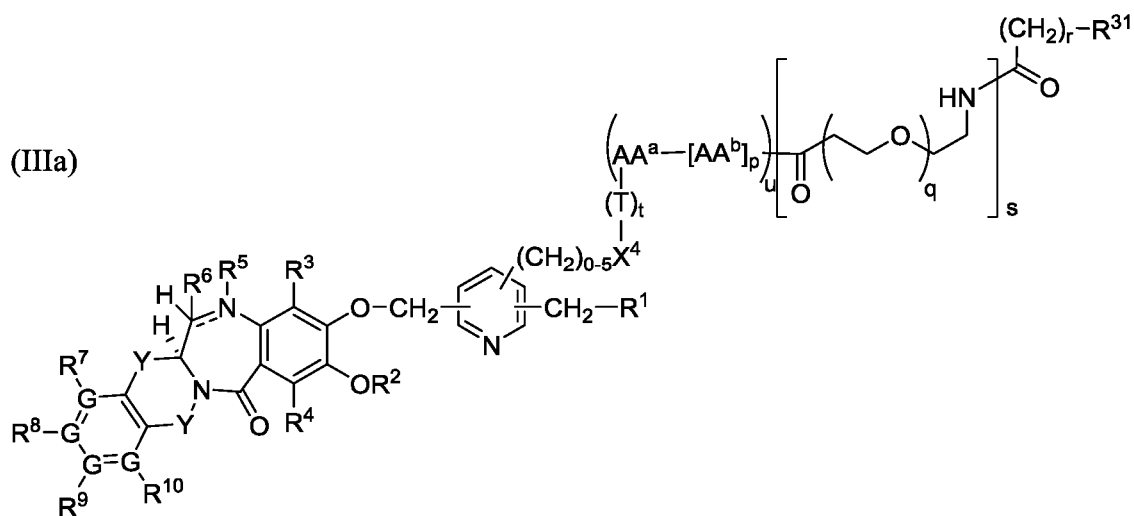
Generalmente, un CAF de un dímero de la presente invención comprende un enlazador unido a un grupo funcional en el dímero, enlazador que está unido al anticuerpo. Como reflejo de la diversidad de técnicas de conjugación disponibles, los dímeros de la presente invención pueden elaborarse en muchos compuestos dímero-enlazador diferentes adecuados para la conjugación con un anticuerpo.

Generalmente, existen tres modos diferentes para la unión del enlazador a un dímero de la presente invención, como se ilustra en las figuras a continuación (con variables y sustituyentes opcionales en los anillos que no se muestran por simplicidad):



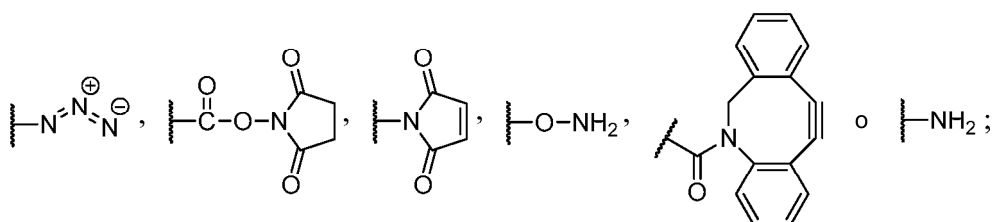
En compuestos dímero-enlazador de tipo (a), un grupo funcional para la unión del enlazador se ubica en el puente X entre las dos mitades del dímero. En compuestos dímero-enlazador de tipo (b), el enlazador se une como un producto de adición a través de un doble enlace imina. En los compuestos dímero-enlazador de los tipos (c) y (c'), un grupo funcional para la unión del enlazador se ubica en un anillo "exterior" de una unidad dimérica de THIQ, AZI o PBD.

En una realización, el compuesto dímero-enlazador de tipo (a) puede representarse por la fórmula (IIIa):

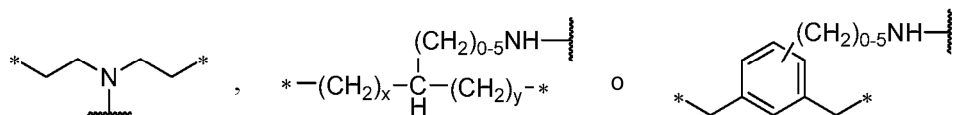


en la que

- 5 T es un grupo autoinmolante;  
 t es 0 o 1;  
 AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
 10 u es 0 o 1; p es 1, 2, 3 o 4;  
 q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (preferentemente 2, 3, 4 u 8);  
 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
 s es 0 o 1;  
 15 R<sup>31</sup> es



X<sup>A</sup> es



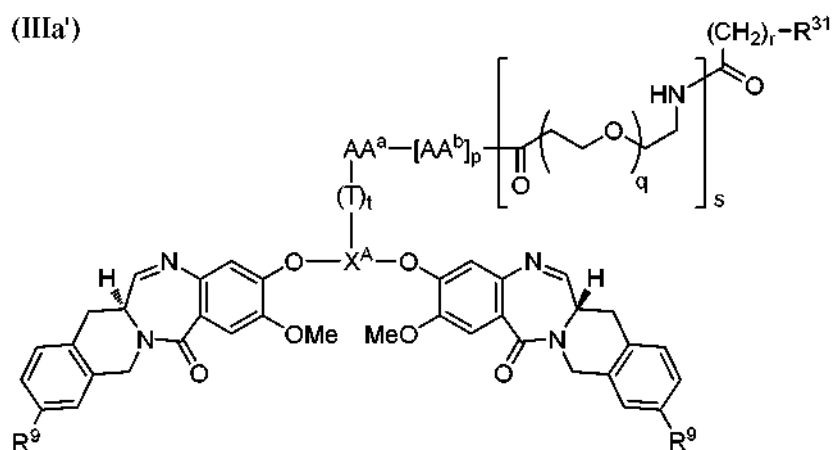
20

donde cada x e y es 1, 2 o 3 con la condición de que la suma de x e y es 2 o 4; el asterisco (\*) indica las posiciones de enlace de cada X<sup>A</sup> al O adyacente y R<sup>1</sup>; y la línea ondulada ~~~~~ indica la posición de unión de cada X<sup>A</sup> a T si T está presente o a AA<sup>a</sup> si T está ausente; y

- 25 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, G, Y, y la línea doble = son como se definen en la sección el BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento, con respecto a la fórmula (I).

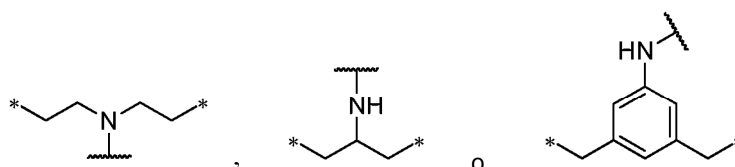
En una realización preferida, u es 1 en la fórmula (IIIa).

- 30 Un compuesto de dímero-enlazador de tipo (a) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIa) está representado por la fórmula (IIIa'):

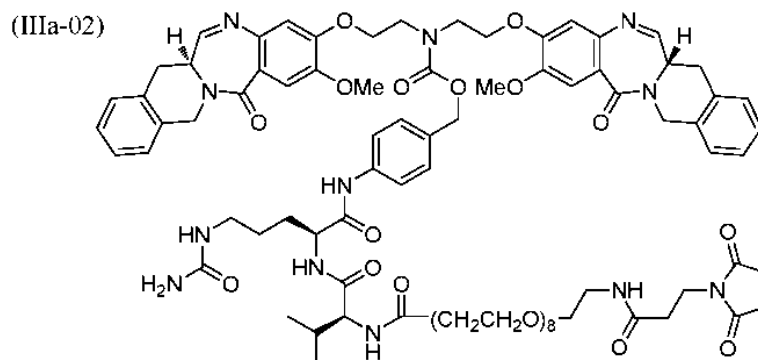
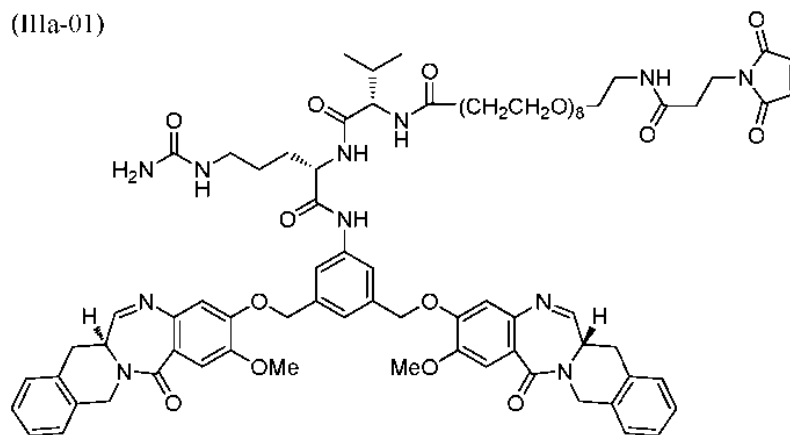


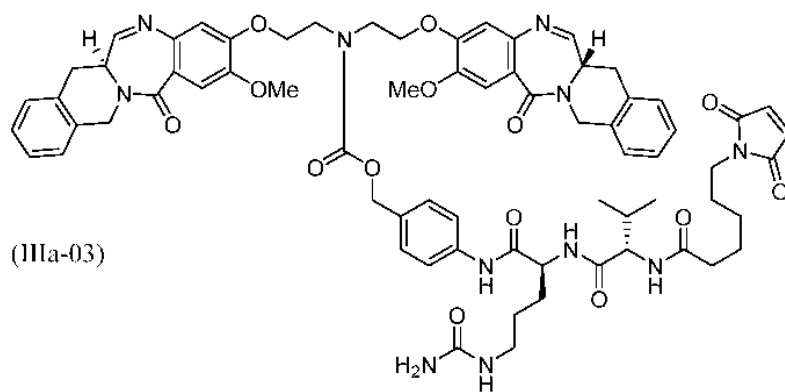
en la que cada R<sup>9</sup> es independientemente H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), OH, Cl, F o Br.

5 Preferentemente, en las fórmulas (IIIa) y (IIIa'), X<sup>A</sup> es

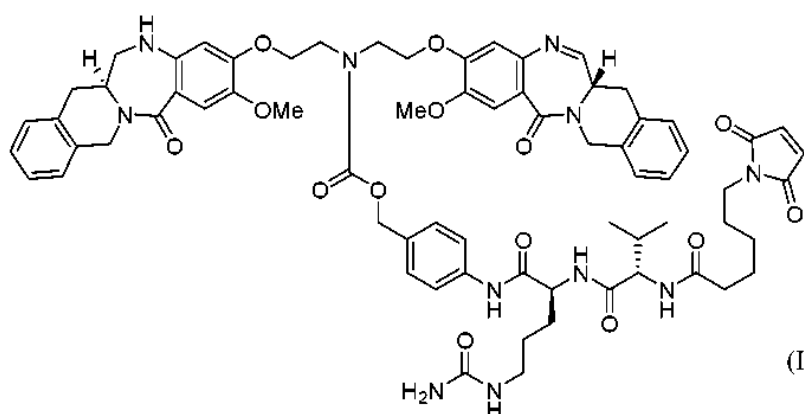


Ejemplos de compuestos de dímero-enlazador de tipo (a) incluyen:

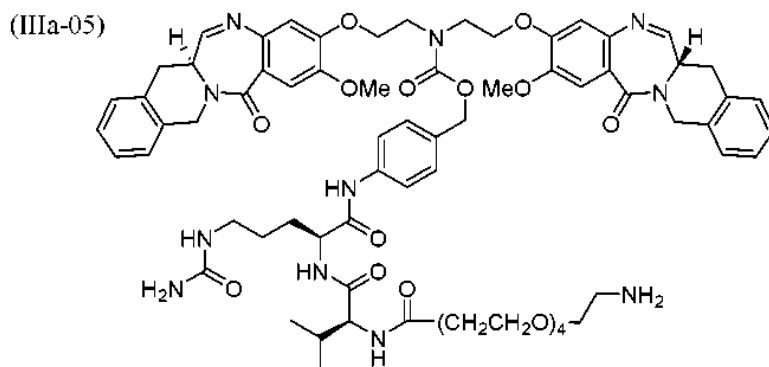




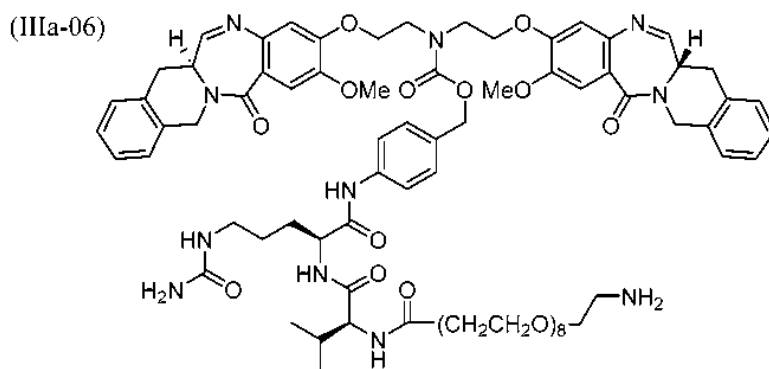
(IIIa-03)



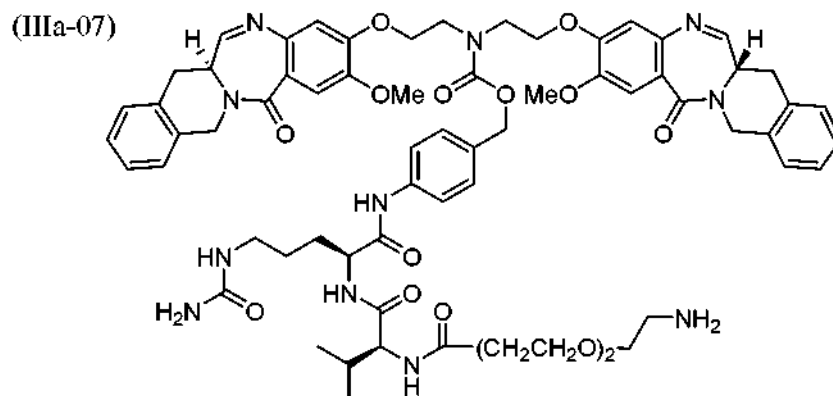
(IIIa-04)



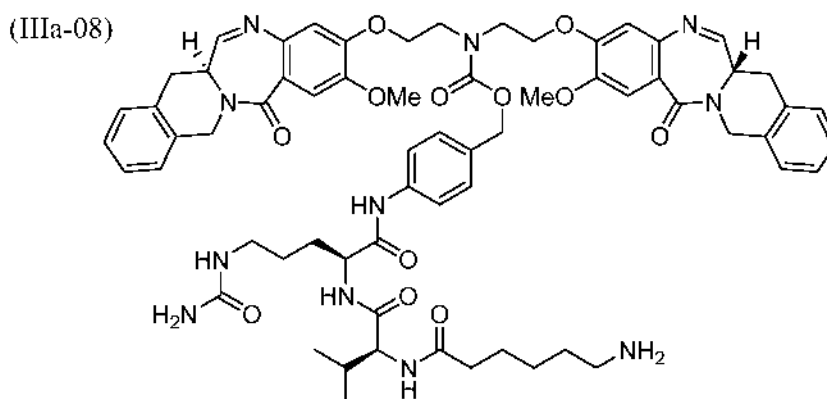
(IIIa-05)



(IIIa-06)

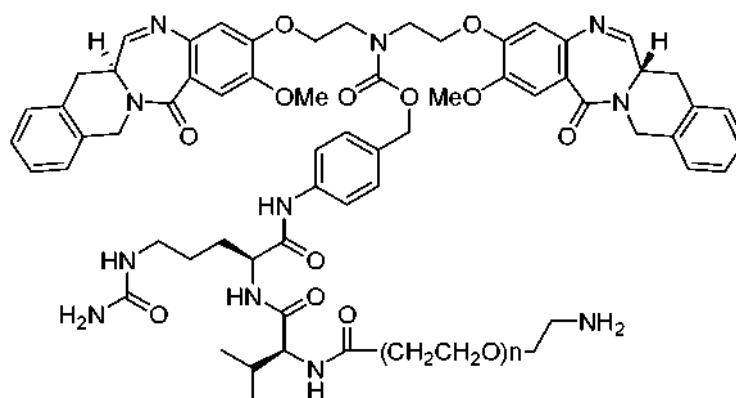


y



5

Se prefiere in subgénero de dímero-enlazadores de acuerdo con la siguiente fórmula



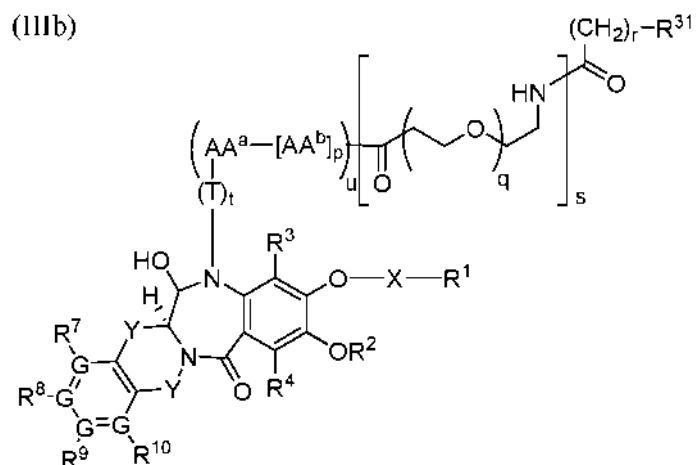
10

donde el subíndice n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12.

Los compuestos enlazadores de dímero de tipo (a) especialmente preferidos son (IIIa-03) y (IIIa-04).

15

En otra realización, los compuestos de enlace dímero de tipo (b) se pueden representar mediante la fórmula (IIIb)

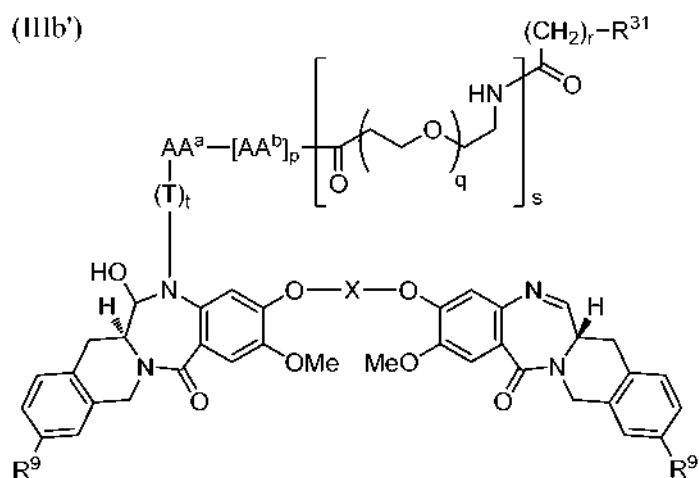


en la que

- 5 T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y R<sup>31</sup> son como se definen con respecto a la fórmula (IIIa); y R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, X, Y y G son como se definen en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

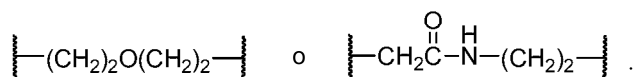
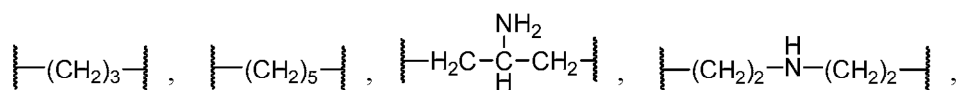
En una realización preferida, u es 1 en la fórmula (IIIb).

Un dímero de tipo (b) preferido de acuerdo con la fórmula (IIIb) está representado por la fórmula (IIIb')



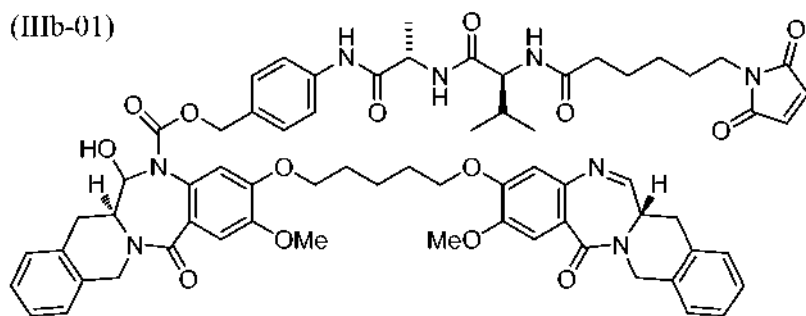
en la que

cada R<sup>9</sup> es independientemente H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), OH, Cl, F o Br; y X es

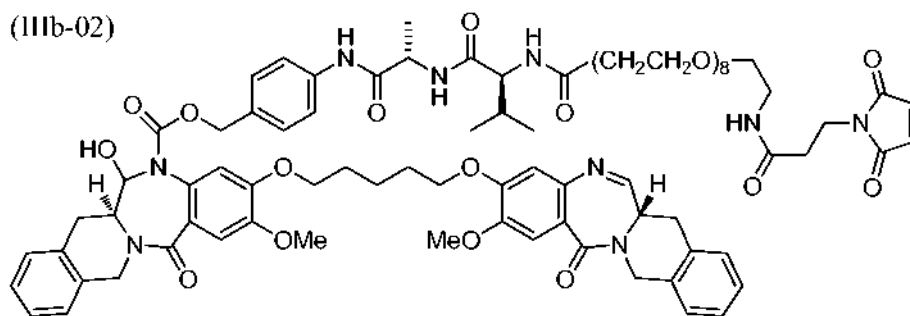


Ejemplos de compuestos de dímero-enlazador de tipo (b) incluyen:

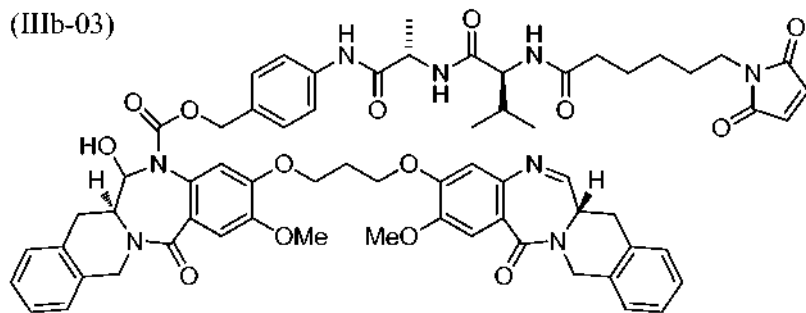
(IIIb-01)



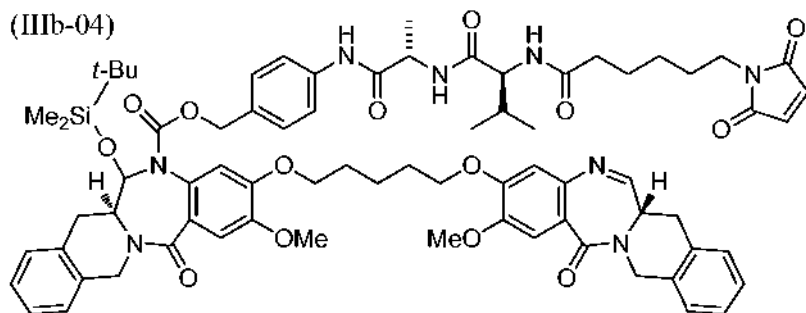
(IIIb-02)



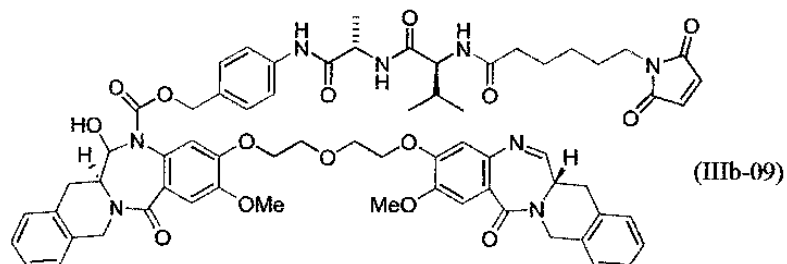
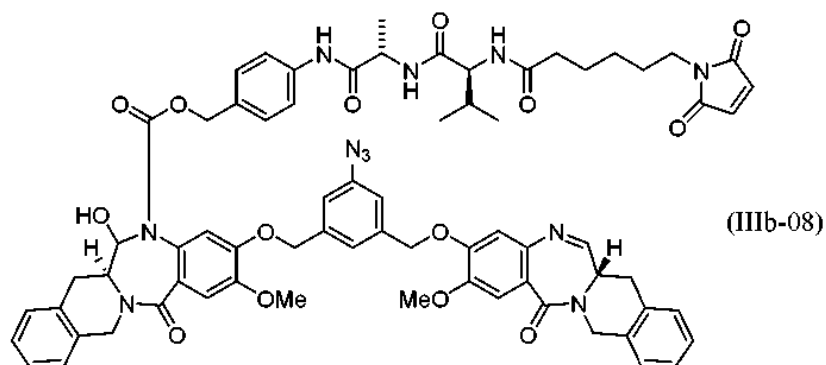
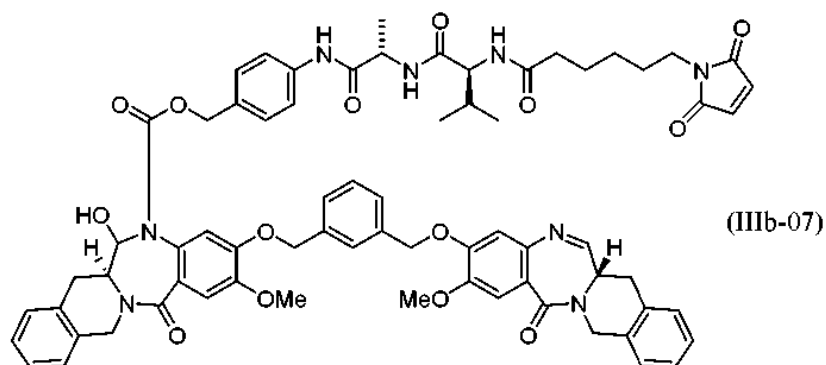
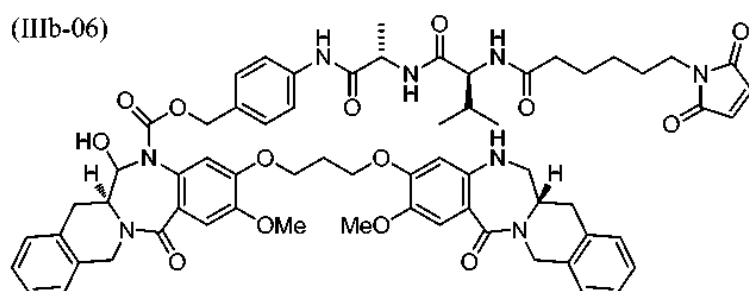
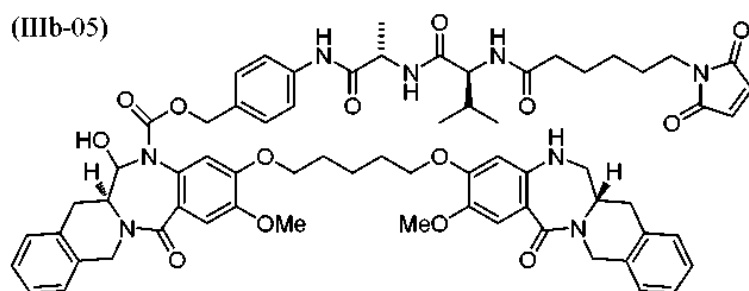
(IIIb-03)



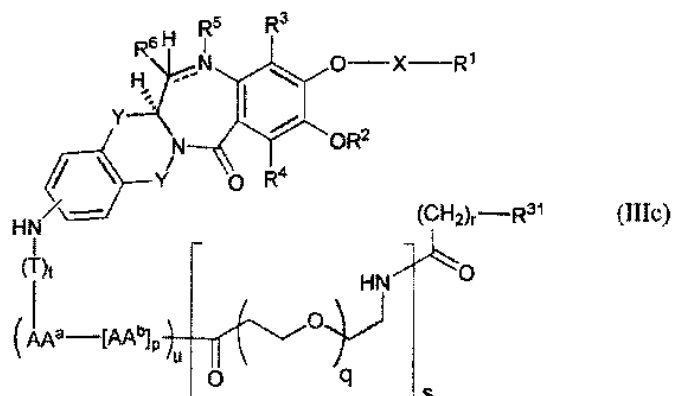
(IIIb-04)







En una realización, los compuestos de dímero-enlazador de tipo (c) pueden representarse por la fórmula (IIIc):



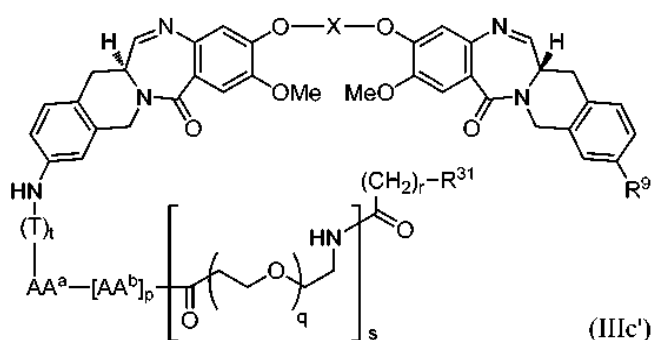
5 en la que

T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y R<sup>31</sup> son como se definen con respecto a la fórmula (IIIa); y

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, Z y la línea doble  son como se definen en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

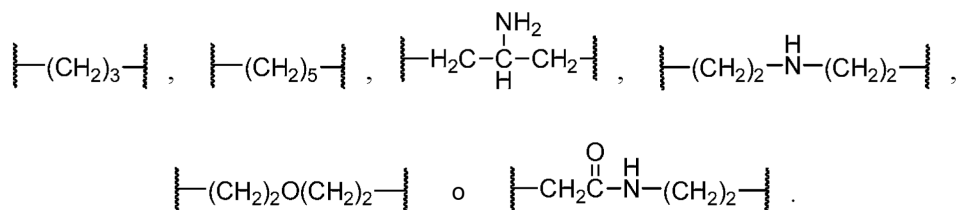
En una realización preferida,  $u$  es 1 en la fórmula (IIIc).

Un compuesto de dímero-enlazador de tipo © preferido de acuerdo con la fórmula (IIIc) está representado por la fórmula (IIIc'':



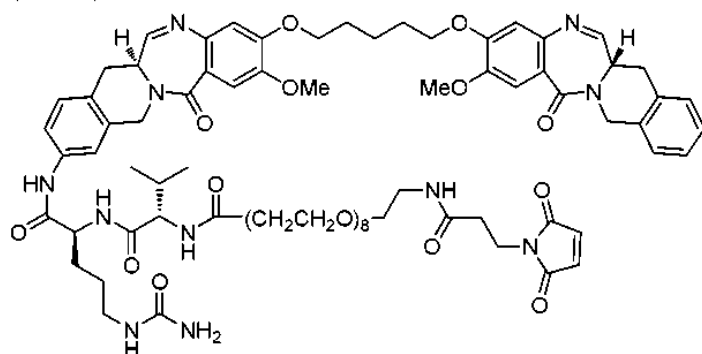
en la que

20 R<sup>9</sup> es H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), OH, Cl, F o Br; y  
X es

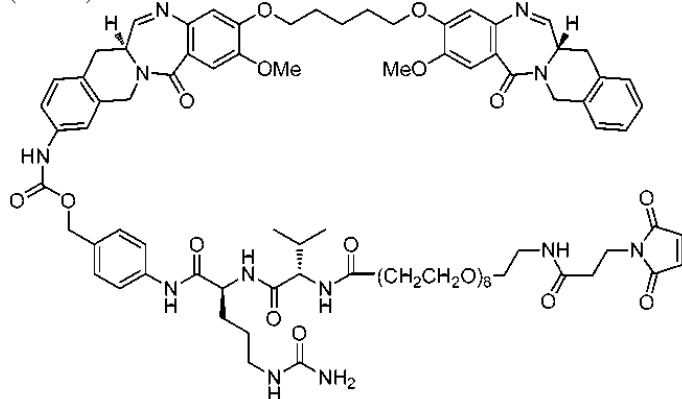


Ejemplos de compuestos de dímero-enlazador de tipo (c) incluyen:

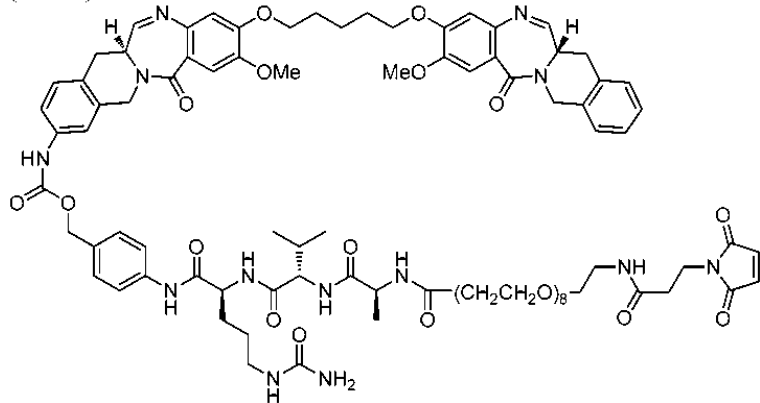
(IIIc-01)



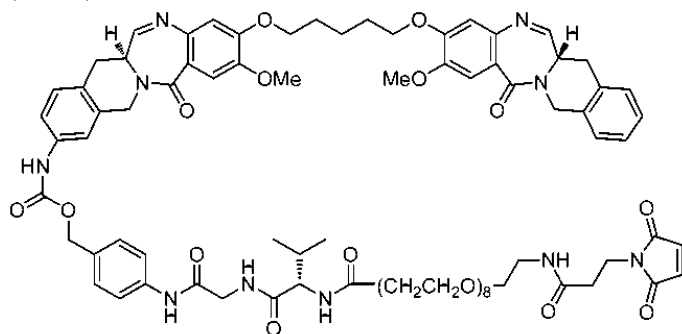
(IIIc-02)



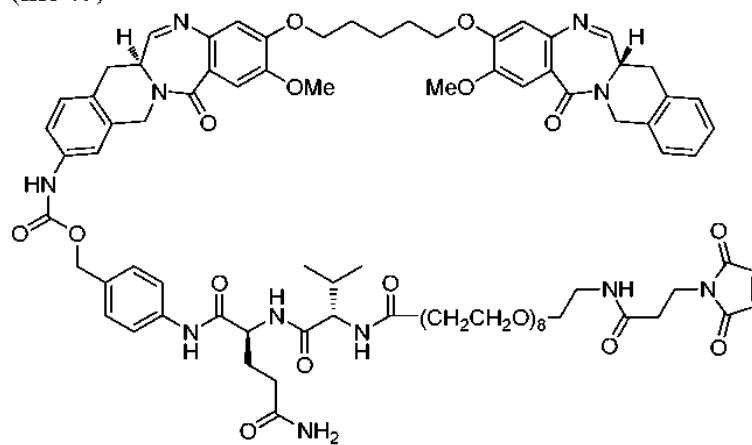
(IIIc-03)



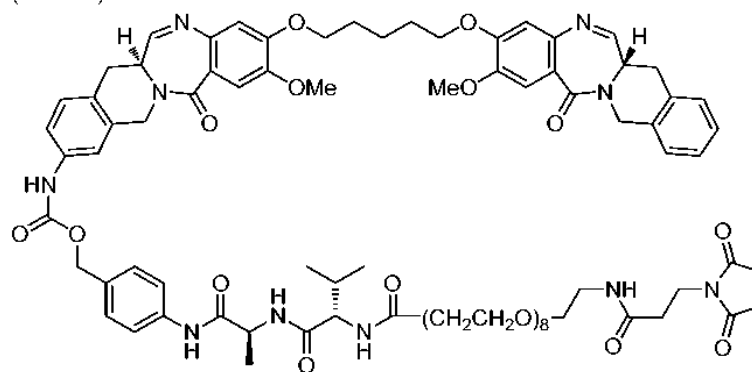
(IIIc-04)



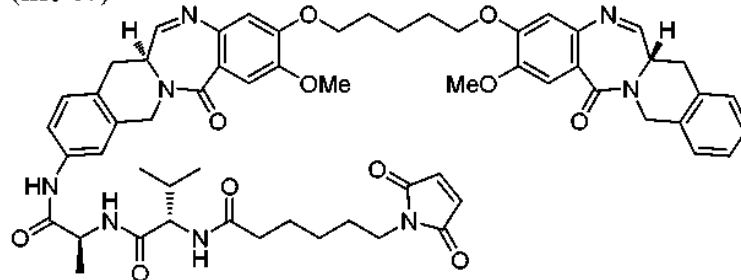
(IIIc-05)



(IIIc-06)

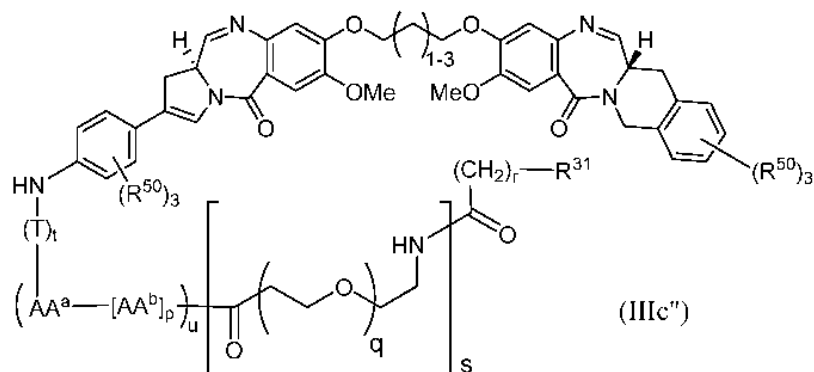


(IIIc-07)



y

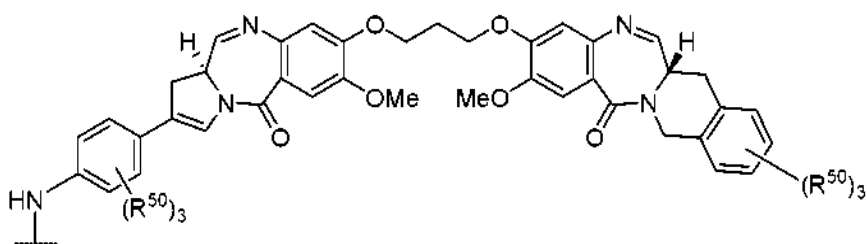
Un dímero-enlazador de tipo (c') preferido está representado por la fórmula (IIIc''):



en la que

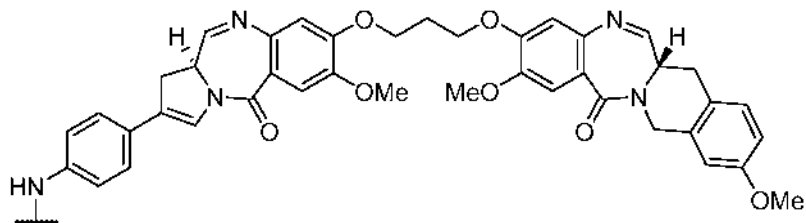
- 5 T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y R<sup>31</sup> son como se definen con respecto a la fórmula (IIIa); y cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN.

Preferentemente, en la fórmula (IIIc''), el resto



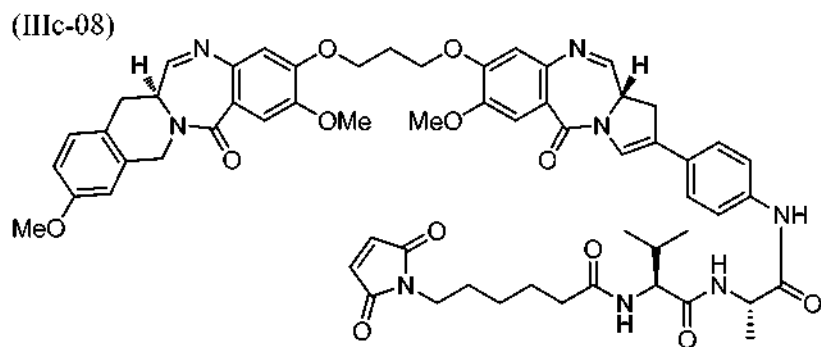
10

es



15

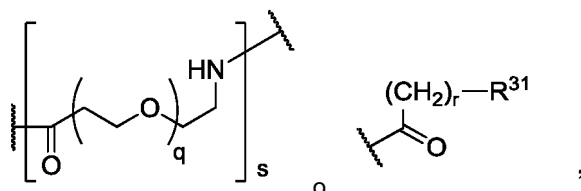
Un ejemplo de dímero-enlazador de acuerdo con la fórmula (IIIc'') es:



- 20 Un compuesto de dímero-enlazador de tipo (c)/(c') especialmente preferido es (IIIc-08).

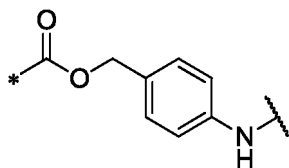
R<sup>31</sup> en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc') y (IIIc'') es un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional complementario en el anticuerpo para efectuar la conjugación, como se describió anteriormente.

En las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc'), y (IIIc''), -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- representa un polipéptido cuya longitud está determinada por el valor de p (dipéptido si p es 1, tetrapéptido si p es 3, etc.) AA<sup>a</sup> está en el extremo carboxi del polipéptido y su grupo carboxilo forma un enlace peptídico (amida) con un nitrógeno de amina del dímero. Por el contrario, el último AA<sup>b</sup> está en el extremo amino del polipéptido y su grupo α-amino forma un enlace peptídico con

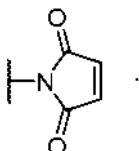


dependiendo de si s es 1 o 0, respectivamente. Son polipéptidos -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- preferidos Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit, escritos en la dirección de N a C convencional, como en H<sub>2</sub>N-Val-Cit-CO<sub>2</sub>H). Más preferentemente, el polipéptido es Val-Cit, Val-Lys o Val-Ala. Preferentemente, un polipéptido -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>- es escindible por una enzima que se encuentra dentro de la célula diana (cancerosa), por ejemplo, una cathepsina y, especialmente, la cathepsina B.

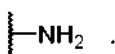
Como indica el subíndice t igual a 0 o 1, un grupo autoinmolante T está opcionalmente presente en compuestos dímero-enlazador de fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc') y (IIIc''). Cuando está presente, el grupo autoinmolante T es preferentemente un grupo p-aminobencil oxicarboxilo (PABC), cuya estructura se muestra a continuación, indicando un asterisco (\*) el extremo del PABC unido a un nitrógeno de amina del dímero e indicando una línea ondulada (~~~~~) el extremo unido al polipéptido -AA<sup>a</sup>-[AA<sup>b</sup>]<sub>p</sub>-.



En una realización preferida, en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc') o (IIIc'') el grupo R<sup>31</sup> es



En otra realización preferida, en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc') o (IIIc'') el grupo R<sup>31</sup> es



### Preparación de conjugados

Este procedimiento general se basa en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo por reacción de grupos ε-amino de lisina con 2-iminotiolano, seguida de la reacción con un resto fármaco-enlazador que contiene maleimida, tal como se ha descrito anteriormente. Inicialmente, al anticuerpo se le intercambia el tampón en tampón de fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 2 mM y se concentra a 5-10 mg/ml. La tiolación se consigue a través de la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano que se ha de añadir puede determinarse mediante un experimento preliminar y varía de un anticuerpo a otro. En el experimento preliminar, se añade una titulación de cantidades crecientes de 2-iminotiolano al anticuerpo y después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h a TA (temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C), el anticuerpo se desala en HEPES 50 mM, Glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5 usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos tiol introducidos se determina rápidamente por reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de los grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, que puede controlarse espectroscópicamente a 324 nm. Se usan normalmente muestras a una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm puede usarse para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras y después se incubaba una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 min a TA. También se incubaban muestras en blanco de tampón solo más DTDP. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol usando un coeficiente de extinción para la

tiopiridina de  $19.800 \text{ M}^{-1}$ .

Normalmente, es deseable un nivel de tiolación de aproximadamente dos a tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos esto puede conseguirse mediante la adición de un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguida de la incubación a TA durante 1 h. Después, el anticuerpo se incuba con 2-iminotiolano a la relación molar deseada y después se desala en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, DTPA 2 mM, pH 5,5)). El material tiolado se mantiene en hielo mientras que el número de tioles introducidos se cuantifica como se ha descrito anteriormente.

Después de la verificación del número de tioles introducidos, el resto fármaco (dímero)-enlazador se añade a un exceso molar de 2,5 veces por tiol. Se permite que la reacción de conjugación transcurra en un tampón de conjugación que contiene una concentración final de propilenglicol al 25 % y trehalosa al 5 %. Comúnmente, la solución madre de fármaco-enlazador se disuelve en DMSO al 100 %. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incuba a TA durante 2 h con agitación suave. Después se añade un exceso molar de 10 veces de N-etil maleimida (Solución madre 100 mM en DMSO) a la mezcla de conjugación y se agitan durante una hora adicional para bloquear cualquier tiol sin reaccionar.

Después, la muestra se filtra a través de un filtro de  $0,2 \mu$ . Al material se le intercambia el tampón a través de la membrana TFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO PES en glicina 10 mg/ml, sorbitol 20 mg/ml, acetonitrilo al 15 % pH 5,0 (volumen de intercambio de tampón 5X TFF) para retirar cualquier fármaco sin reaccionar. La formulación final se realiza por TFF en sorbitol 20 mg/ml, glicina 10 mg/ml, pH 5,0.

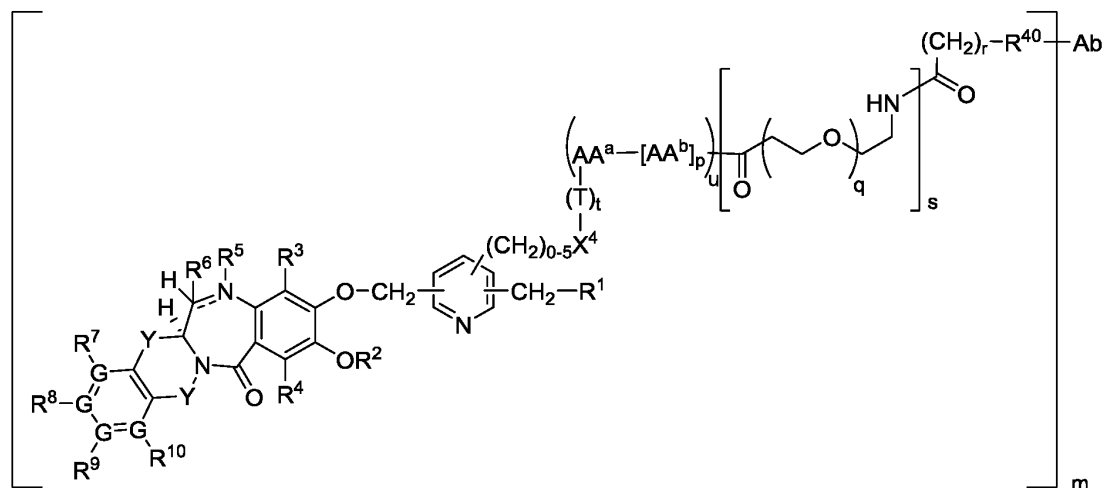
El siguiente procedimiento puede usarse para la conjugación mediada por transglutaminasa de compuestos dímero-enlazador en los que el enlazador tiene un grupo amina que puede actuar como donador de amina. El anticuerpo puede ser uno que tenga una glutamina reactiva con transglutaminasa, por ejemplo, uno con una sustitución N297A o N297Q. La conjugación se realiza mediante transglutaminasa bacteriana recombinante con una relación molar de anticuerpo:enzima de 5:1. La conjugación se realiza usando protocolos convencionales en tampón Tris 50 mM, pH 8,0, incubado durante la noche a  $37^\circ\text{C}$ . El conjugado resultante se purifica en una columna de proteína A, equilibrada previamente con Tris 50 mM, pH 8,0. El conjugado se eluye con tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones eluidas se neutralizan con Tris 1 M pH 9,0. El conjugado puede formularse en sorbitol 20 mg/ml, glicina 10 mg/ml, pH 5,0.

Los expertos en la materia comprenderán que las condiciones y metodologías descritas anteriormente son de ejemplo y no limitantes y que se conocen en la técnica otros enfoques para la conjugación que pueden usarse en la presente invención.

#### Conjugados

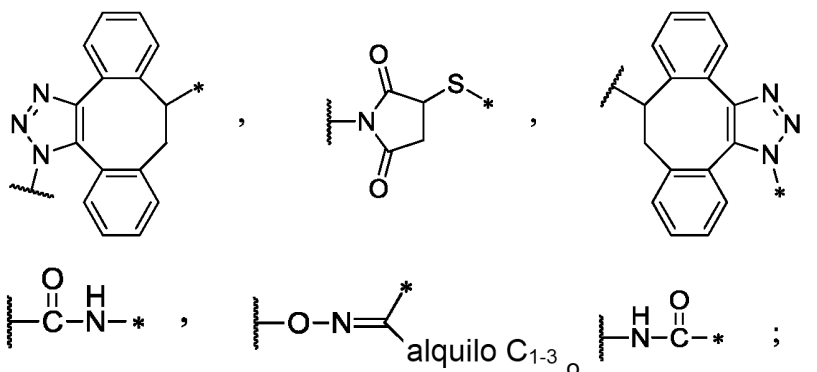
En una realización, los conjugados de la presente invención derivan de compuestos dímero-enlazador de tipo (a) y pueden representarse por la fórmula (IVa):

(IVa)



en la que

Ab es un anticuerpo;  
R<sup>40</sup> es



donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida a Ab se indica con un asterisco (\*) y la valencia abierta de R<sup>40</sup> que está unida a (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> se indica con una línea ondulada (~~~~~);

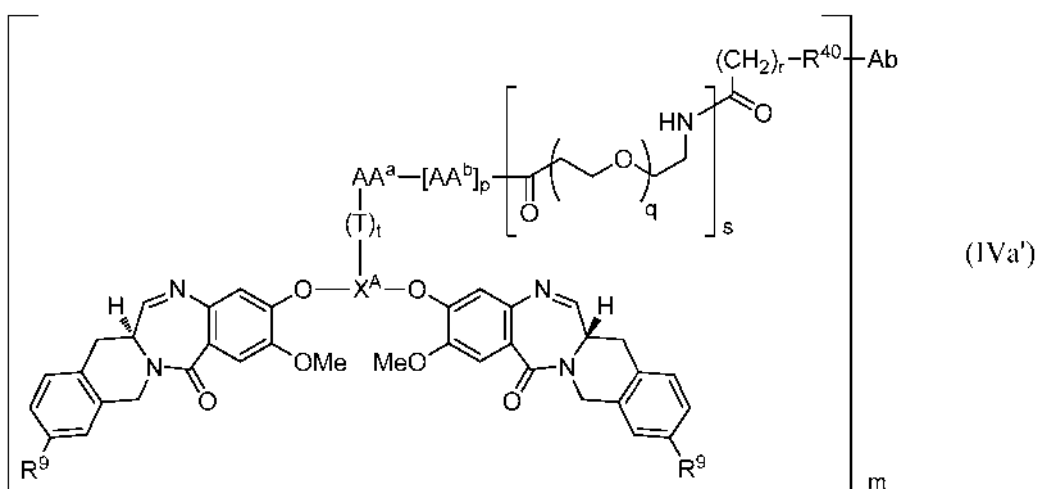
m es 1, 2, 3 o 4;

T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s, r y X<sup>4</sup> son como se han definido con respecto a la fórmula (IIIa); y

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, Y, G y la línea doble  $\equiv$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

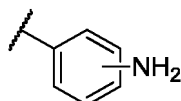
En una realización preferida, u es 1 en la fórmula (IVa).

Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVa) está representado por la fórmula (IVa'):



donde

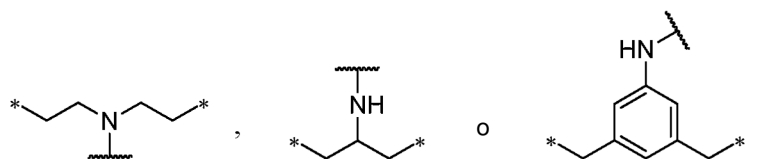
R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, o



(especialmente el *para*-isómero); y

X<sup>A</sup> es

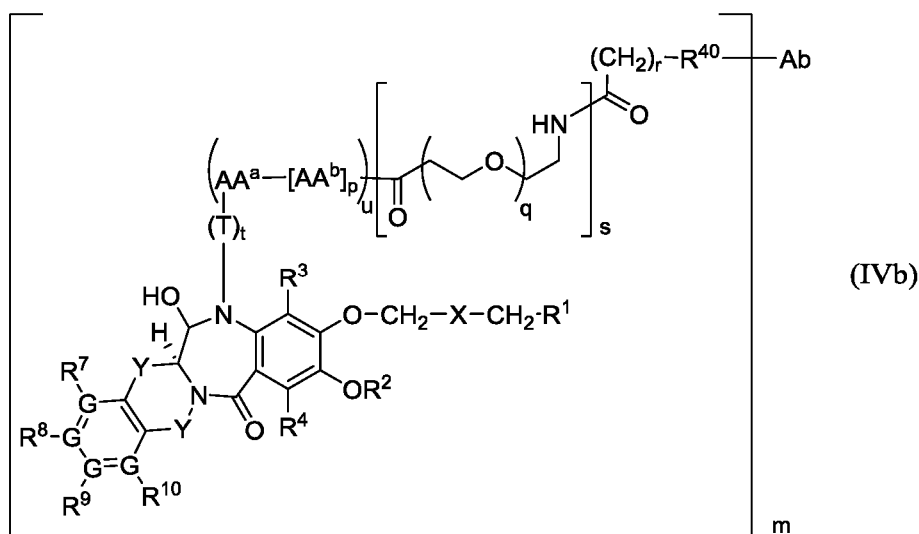




en las que los asteriscos (\*) indican las posiciones de unión de cada  $X^A$  al O adyacente y  $R^1$  y la línea ondulada indica la posición de de cada  $X^A$  a T si T está presente o a  $AA^a$  si T está ausente.

5

En otra realización, los conjugados de la presente invención derivan de compuestos dímero-enlazador de tipo (b) y pueden representarse por la fórmula (IVb):



10

en la que

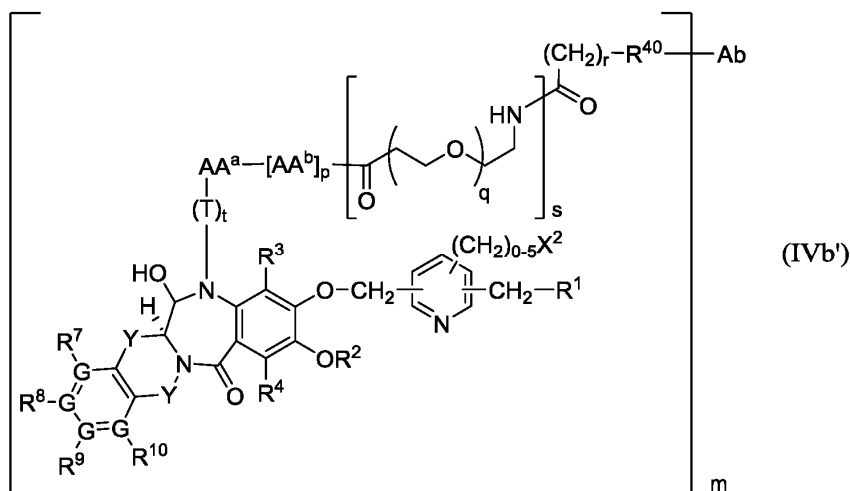
$Ab$ ,  $R^{40}$ ,  $m$ ,  $T$ ,  $t$ ,  $AA^a$ ,  $AA^b$ ,  $u$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $s$  y  $r$  son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa); y  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $Y$ ,  $G$  y  $X$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (I).

15

En una realización preferida,  $u$  es 1 en la fórmula (IVb).

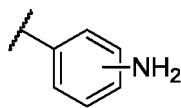
Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVb) se representa por la fórmula (IVb'):

20

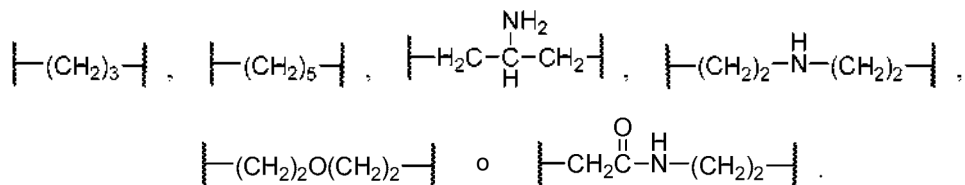


en la que

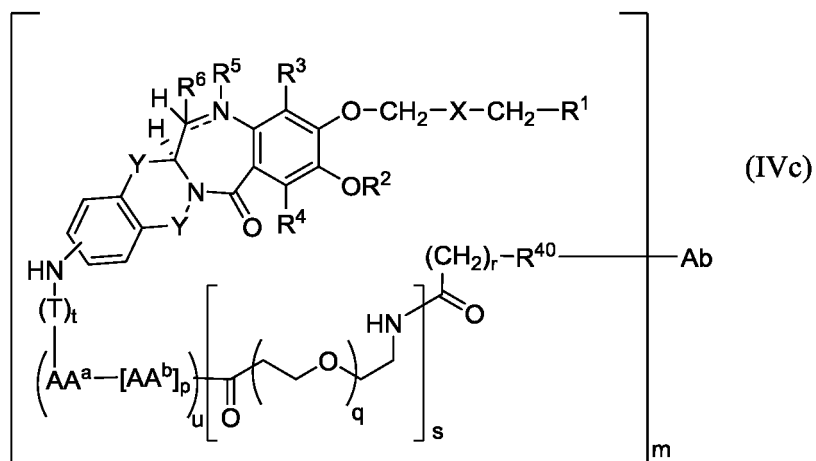
R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, o



5 (especialmente el *para*-isómero); y  
X es



10 En otra realización, los conjugados de la presente invención derivan de compuestos dímero-enlazador de tipo (c) y pueden representarse por la fórmula (IVc):



15 en la que

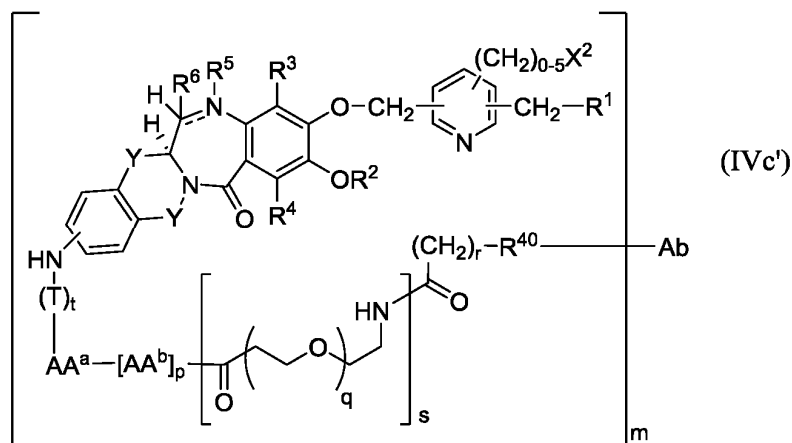
Ab, R<sup>40</sup>, m, T, t, AA<sup>a</sup>, AA<sup>b</sup>, u, p, q, s y r son como se han definido con respecto a la fórmula (IVa); y

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, Y, X y la línea doble  $\text{---}$  son como se han definido en la sección BREVE SUMARIO DE LA INVENCION anteriormente en el presente documento.

20

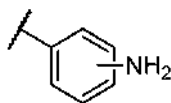
En una realización preferida, u es 1 en la fórmula (IVc).

Un conjugado preferido de acuerdo con la fórmula (IVc) se representa por la fórmula (IVc'):



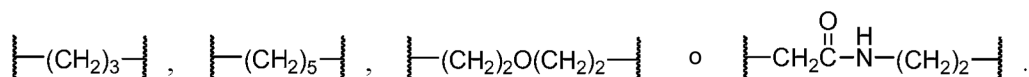
en la que

$R^9$  es H, OH, OMe,  $NH_2$ ,  $NMe_2$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}Me$ ,  $OCH_2CH_2OH$ , o

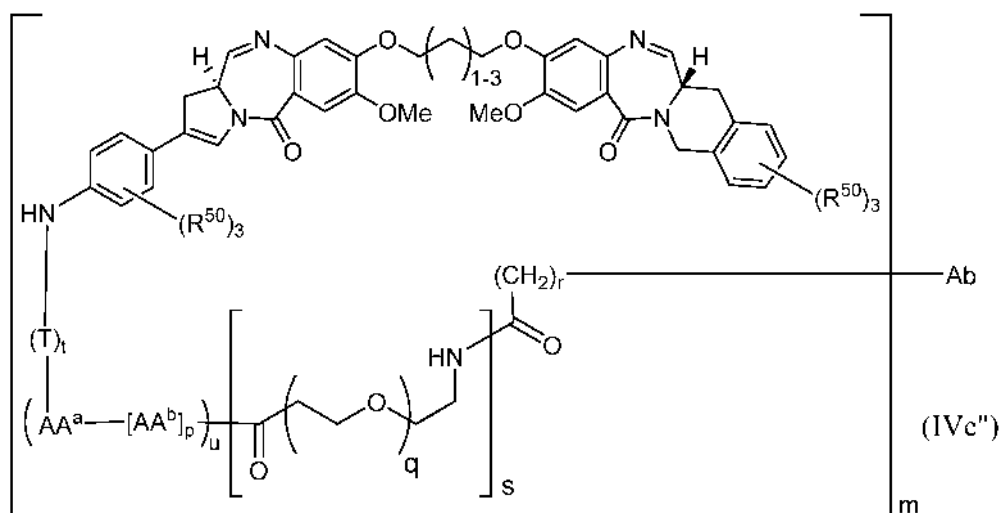


(especialmente el *para*-isómero); y

X es



En otra realización preferida, un conjugado de esta invención tiene una estructura representada por la fórmula (IVc'')



en la que Ab,  $R^{40}$ , m, T, t,  $AA^a$ ,  $AA^b$ , u, p, q, s y r son como se definen con respecto a la fórmula (IVa); cada  $R^{50}$  es independientemente H, O(alquilo  $C_1-C_3$ ), O(alquilenos  $C_2-C_3$ ), O(alquinilo  $C_2-C_3$ ), F, Cl, Br o CN.

Las preferencias indicadas anteriormente en el presente documento con respecto a los dímero-enlazadores de fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb), (IIIb'), (IIIc), (IIIc'), (IIIc'') y para el polipéptido -  $AA^a$ -[ $AA^b$ ]<sub>p</sub>- y el grupo T autoinmolante también son aplicables a conjugados de fórmulas (IVa), (IVa'), (IVb), (IVb'), (IVc), (IVc') y (IVc'').

En las fórmulas (IVa), (IVb), (IVc) y (IVc''), si los subíndices t y u son los dos 0, entonces el enlazador es del tipo no escindible y se basa en la degradación del anticuerpo Ab para liberar el fármaco. El componente de polietilenglicol opcionalmente puede estar presente (es decir, s es 1) si su presencia es beneficiosa, por ejemplo, mediante el aumento de la solubilidad del compuesto fármaco-enlazador durante la conjugación y no interfiere con la actividad biológica del fármaco.

### 30 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o de un conjugado del mismo, formulado junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Puede contener opcionalmente uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales, tales como un anticuerpo u otro fármaco. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una terapia de combinación con otro agente terapéutico, especialmente otro agente antineoplásico.

La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes. Los excipientes que pueden usarse incluyen vehículos, agentes tensioactivos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes aromatizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, edulcorantes, conservantes, agentes isotónicos y combinaciones de los mismos. La selección y uso de

excipientes adecuados se enseña en Gennaro, ed., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003).

5 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede recubrirse con un material para protegerlo de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivarlo. La frase "administración parenteral" se refiere a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, por lo general por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, 10 intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles. También pueden formularse en una microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para lograr una alta concentración de fármaco. Las composiciones también pueden proporcionarse en forma de liofilizados, para su reconstitución en agua antes de la administración.

20 La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración y generalmente será esa cantidad de la composición la que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por 25 ciento, más preferentemente desde aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o 30 aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. "Forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se han de tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo 35 farmacéutico requerido.

La dosis varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg y más por lo general de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1- 40 10 mg/kg o, como alternativa, de 0,1 a 5 mg/kg. Las pautas de tratamiento de ejemplo son la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Las pautas de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal a través de administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (ii) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, después cada tres meses; (ii) cada 45 tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una sola vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración plasmática de anticuerpos de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, aproximadamente 25-300 µg/ml.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención preferentemente da como resultado una 50 disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos portadores de tumores, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 % y aún más 55 preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % con respecto a sujetos sin tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño tumoral o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto, que normalmente es un ser humano pero puede ser otro mamífero.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación controlada o sostenida, incluyendo implantes, 60 parches transdérmicos y sistemas de entrega microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

65 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse a través de dispositivos médicos tales como (1) dispositivos de inyección hipodérmica sin aguja (por ejemplo, documento US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413;

4.941.880; 4.790.824; y 4.596.556); (2) bombas de microinfusión (documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (documento US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (documento US 4.439.196 y 4.475.196).

- 5 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la barrera hematoencefálica, pueden formularse en liposomas, que pueden comprender adicionalmente restos de direccionamiento para potenciar el transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, por ejemplo, los documentos US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016; y 5.399.331; V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685; 10 Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038; Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180; Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinänen y Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; y Killion y Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

## 15 USOS

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden usarse para tratar enfermedades tales como, pero sin limitación, enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de cabeza y cuello que incluyen tumores de cabeza, cuello, la cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, 20 glándulas salivales y paragangliomas; cánceres de hígado y árbol biliar, en particular carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, en particular cáncer colorrectal; cáncer de ovario; cáncer de pulmón microcítico y no microcítico (CPM y CPNM); sarcomas de cáncer de mama, tales como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rabdomiosarcoma embrionario, leiomisosarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma alveolar de partes blandas; leucemias tales como leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mielógena crónica (LMC); neoplasias del 25 sistema nervioso central, en particular cáncer cerebral; mieloma múltiple (MM), linfomas tales como linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma de células grandes anaplásico de linfocitos T. Clínicamente, la puesta en práctica de los métodos y el uso de las composiciones que se describen en el presente documento dará como resultado una reducción en el tamaño o número del crecimiento canceroso y/o una reducción en los síntomas asociados (cuando corresponda). Patológicamente, la puesta en práctica del método y el uso de las composiciones que se describen en el presente documento producirán una respuesta relevante patológicamente, tal como: inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción del tamaño del cáncer o tumor, prevención de metástasis adicionales e inhibición de la angiogénesis tumoral. El método de tratamiento de 35 dichas enfermedades comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación inventiva a un sujeto. El método puede repetirse según sea necesario. Especialmente, el cáncer puede ser renal, pulmonar, gástrico u ovárico.

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden administrarse en combinación con otros agentes 40 terapéuticos, incluyendo anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de la angiogénesis, antimetabolitos, escindidores de ADN, entrecruzadores de ADN, intercaladores de ADN, aglutinantes del surco menor del ADN, enediínas, inhibidores de la proteína de choque térmico 90, inhibidores de la histona deacetilasa, inmunomoduladores, estabilizadores de microtúbulos, análogos de nucleósidos (purina o pirimidina), inhibidores de exportación nuclear, inhibidores del proteasoma, inhibidores de topoisomerasas (I o II), inhibidores de tirosina cinasa 45 e inhibidores de serina/treonina cinasa. Los agentes terapéuticos específicos incluyen adalimumab, ansamitocina P3, auristatina, bendamustina, bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfán, calistatina A, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, cisplatino, cladribina, citarabina, criptoficinas, dacarbazina, dasatinib, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, epotilonas, etopósido, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, ipilimumab, hidroxiurea, imatinib, infliximab, 50 interferones, interleucinas, h-lapachona, lenalidomida, irinotecán, maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina C, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), 6-tioguanidina, tiotepa, tenipósido, topotecán, trastuzumab, tricostatina A, vinblastina, vincristina y vindesina.

## 55 Ejemplos

La puesta en práctica de la presente invención puede comprenderse adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación. Los siguientes procedimientos generales son ilustrativos, y los expertos en la materia comprenden que pueden usarse métodos alternativos pero 60 equivalentes.

Algunos espectros de RMN-<sup>1</sup>H se ejecutaron en instrumentos Bruker 600, 500 o 400 MHz y los desplazamientos químicos se publicaron en ppm ( $\delta$ ) con respecto al tetrametilsilano ( $\delta = 0,0$ ). Generalmente, las evaporaciones se realizaron a presión reducida.

65 Estos dos métodos de análisis por CL/EM son ilustrativos:

Columna A: Waters BEH C18, 2,0 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: agua con TFA al 0,05 %; Fase móvil B: acetonitrilo con TFA al 0,05 %; [2-98 % en 1,5 min, con un tiempo de ejecución de 3 min]; Temperatura: 40 °C; Flujo: 0,8 ml/min y un detector de UV ajustado a 220 o 254 nm.

5 Columna B: PhenomenexLuna, 2,0 x 30 mm, partículas de 3 µm; Fase móvil A: 10 % de acetonitrilo/90 % de agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90 % de acetonitrilo/10 % de agua con TFA al 0,1 %; [0-100 % en 2 min, con un tiempo de ejecución de 4 min]; Temperatura: 40 °C; Flujo: 1,0 ml/min y un detector de UV ajustado a 220 o 254 nm.

## 10 **Ejemplo 1 - Compuesto intermedio 6**

Este ejemplo y la **Fig. 1** se refieren a la síntesis del compuesto intermedio **6**, que se usa para la preparación de dímeros de la presente invención.

15 Se preparó cloruro de 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoílo **1** a partir del éster metílico correspondiente de la siguiente manera: A una solución de 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoato de metilo (Harve Chem, 15 g, 47,3 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 350 ml) se le añadió una solución de NaOH ac. (56,7 ml, 142 mmol, 2,5 M). La reacción se agitó a 50 °C durante 5 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente (TA) y después se concentró al vacío para retirar el THF. La capa acuosa restante se acidificó con HCl ac. (6 N) a pH 2. El precipitado de color amarillo

20 resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para proporcionar ácido 4-(benciloxi)-5-metoxi-2-nitrobenzoico (14,32 g, rendimiento del 100 %). CLEM (M+H) = 304,08. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, METANOL-d<sub>4</sub>) δ 7,60 (s, 1H), 7,53 - 7,45 (m, 2H), 7,45 - 7,31 (m, 3H), 7,29 (s, 1H), 5,23 (s, 2H), 3,98 (s, 3H).

25 A una solución del ácido nitrobenzoico anterior (3,5 g, 11,54 mmol) en THF (150 ml) se le añadió gota a gota cloruro de oxalilo (1,212 ml, 13,85 mmol), seguido de N,N-dimetilformamida (DMF, 50 µl). La solución resultante se agitó a TA durante 2 h antes de concentrarse al vacío para proporcionar cloruro de ácido **1** en forma de un sólido de color amarillo.

30 El cloruro ácido **1** se disolvió en THF (35 ml) y se añadió gota a gota a una solución de sal de ácido p-toluenosulfónico de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato de (S)-bencilo **2** (Accela, 5,58 g, 12,70 mmol) y trietilamina (4,83 ml, 34,6 mmol) en THF (80 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h antes de que se inactivase con agua y se concentró para retirar el THF. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. y después salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO

35 (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/diclorometano (DCM) en 15 minutos) para proporcionar el éster **3** (6,25 g, rendimiento del 98 %). CLEM (M+H) = 553. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,95 - 7,72 (m, 1H), 7,57 - 7,35 (m, 5H), 7,34 - 7,0 (m, 8H), 7,14 - 6,98 (m, 1H), 6,94 - 6,69 (m, 1H), 5,39 - 5,19 (m, 2H), 5,19 - 5,08 (m, 1H), 4,99 (c, J = 12,4 Hz, 1H), 4,75 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,65 - 4,40 (m, 2H), 4,28 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 3,86 (s. a., 3H), 3,71 (s, 1H), 3,50 - 3,18 (m, 1H).

40 Una suspensión de éster **3** (6,25 g, 11,31 mmol), cinc (4,44 g, 67,9 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (7,26 g, 136 mmol) en MeOH (50 ml) se calentó a 50 °C durante 16 h. La reacción se enfrió a TA y se diluyó con MeOH. La mezcla resultante se filtró a través de un lecho de CELITE™, lavando sucesivamente con EtOAc, DCM y MeOH. Los filtrados se combinaron y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 120 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/DCM en 15 minutos) para proporcionar diona **4** (4,5 g, rendimiento del 96 %). CLEM (M+H) = 415. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,49 - 7,40 (m, 4H), 7,32 (s. a., 6H), 6,45 (s, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,13 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,21 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,52 (dd, J = 15,4, 7,0 Hz, 1H), 3,02 (dd, J = 15,4, 6,4 Hz, 1H).

50 Una solución de diona **4** (4,5 g, 10,86 mmol) en DMF (54,3 ml) se enfrió a 0 °C antes de que se añadiese NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,54 g, 13,57 mmol) por lotes. La mezcla resultante se agitó durante 30 min antes de que se añadiese (2-(clorometoxi)etil)trimetilsilano (SEM-Cl, 2,31 ml, 13,03 mmol). La reacción se calentó a TA y se agitó durante 1 h antes de que se interrumpiese con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del

55 producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 50 % de EtOAc/DCM en 15 min) para proporcionar SEM-diona **5** (4,60 g, rendimiento del 78 %). CLEM (M+H) = 545. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,59 - 7,41 (m, 2H), 7,40 - 7,21 (m, 9H), 5,43 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,14 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,50 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,41 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,33 - 4,16 (m, 1H), 4,13 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,82 - 3,46 (m, 3H), 3,06 - 2,84 (m, 1H), 1,26 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 0,97 (ddd, J = 9,9, 6,8, 2,6 Hz, 2H), 0,10 - 0,01 (m, 9H).

60

Una suspensión de SEM-diona **5** (4,68 g, 8,59 mmol) y Pd/C (10 %, 0,457 g) en EtOH (10 ml) se agitó con un globo de H<sub>2</sub> a TA durante 3 h. La reacción se filtró a través de un lecho CELITE™, se lavó con EtOH y se concentró al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 120 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/DCM en 15 min) para proporcionar compuesto **6** (3,23 g, rendimiento del 83 %). CLEM (M+H) = 455. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,40 - 7,21 (m, 5H), 5,97 (s, 1H), 5,46 (d, J =

65

9,7 Hz, 1H), 5,18 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,72 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,58 - 4,24 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,83 - 3,44 (m, 3H), 3,14 - 2,88 (m, 1H), 0,99 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 0,14 (s, 9H).

### Ejemplo 2 - Compuesto intermedio 13

Este ejemplo y la **Fig. 2** se refieren a la síntesis del compuesto intermedio 13, usado en la preparación de dímeros de la presente invención.

Se disolvió cloruro ácido **1** en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a una solución de carboxilato **7** (Borzilleri et al., documento WO 2014/047024 A1 (2014), 1,6 g, 6,39 mmol) y NEt<sub>3</sub> (2,67 ml, 19,2 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. La solución de reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante 30 min. La reacción se interrumpió con agua y se concentró para retirar el THF. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub>, después salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, gradiente del 0 % al 100 % de EtOAc/Hexano en 15 min) para proporcionar el éster etílico **8** (2,66 g, rendimiento del 78 %). CLEM (M+H) = 536,4.

Una suspensión del éster etílico **8** (1,75 g, 3,55 mmol), cinc (1,394 g, 21,32 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (2,281 g, 42,6 mmol) en MeOH (10 ml) se calentó a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™, lavando con una cantidad copiosa de MeOH al 20 % en DCM. El filtrado se concentró para proporcionar amino-diona **9** en forma de un sólido de color blanco (1,25 g, 2,90 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM (M+H) = 430,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,26 (s. a., 1H), 7,53 - 7,31 (m, 6H), 7,24 (s, 1H), 6,92 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,50 - 6,41 (m, 2H), 5,07 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 5,00 - 4,88 (m, 2H), 4,84 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,09 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,01 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,12 (dd, J = 15,3, 7,6 Hz, 1H), 2,78 (dd, J = 15,2, 6,2 Hz, 1H).

A una solución de amino-diona **9** (1,6 g, 3,73 mmol) y cloruro de tritilo (1,246 g, 4,47 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió NEt<sub>3</sub> (0,779 ml, 5,59 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h y se concentró. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 80 g, 0-50 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar tritil-diona **10** en forma de un sólido de color blanco (2,2 g, 3,27 mmol, rendimiento del 88 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 8,01 (s, 1H), 7,50 - 7,12 (m, 22H), 6,77 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,47 - 6,34 (m, 2H), 6,16 (dd, J = 8,1, 2,4 Hz, 1H), 5,02 (s. a., 1H), 4,91 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,18 - 4,09 (m, 2H), 4,05 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,28 (dd, J = 15,4, 7,7 Hz, 1H), 2,75 (dd, J = 15,4, 6,4 Hz, 1H).

A una solución de tritil-diona **10** (2,2 g, 3,27 mmol) en DMF (15 ml) a 0 °C se le añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,236 g, 3,93 mmol). La mezcla se agitó durante 30 min antes de que se añadiese SEM-Cl (0,697 ml, 3,93 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h antes de que se inactivase con salmuera. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 40 g, 0-50 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar SEM-diona **11** (2,1 g, 2,62 mmol, rendimiento del 80 %). CLEM (M-tritilo) = 560,4. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,48 - 7,42 (m, 2H), 7,41 - 7,32 (m, 9H), 7,31 - 7,18 (m, 11H), 6,77 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,19 (dd, J = 8,3, 2,3 Hz, 1H), 5,45 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,08 - 4,92 (m, 2H), 4,49 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,13 - 4,08 (m, 1H), 4,02 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,71 (td, J = 9,6, 7,0 Hz, 1H), 3,61 (td, J = 9,6, 7,2 Hz, 1H), 3,36 (dd, J = 15,5, 8,3 Hz, 1H), 2,72 (dd, J = 15,5, 6,5 Hz, 1H), 1,05 - 0,92 (m, 2H), 0,06 (s, 9H).

Una suspensión de SEM-diona **11** (950 mg, 1,18 mmol) y Pd/C (10 %, 200 mg) en EtOAc (20 ml) se agitó con un globo de H<sub>2</sub> durante 2 días. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™ y se lavó con EtOAc y después con MeOH. Los filtrados combinados se concentraron y se purificaron usando cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 40 g, 0-100 % de EtOAc/Hexano) para proporcionar compuesto **12** (510 mg, 1,08 mmol, rendimiento del 90 %). CLEM (M+H) = 470,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,33 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,09 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,67 - 6,54 (m, 2H), 6,02 (s, 1H), 5,47 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 9,7 Hz, 1H), 4,29 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,22 (dd, J = 7,7, 6,5 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,79 - 3,60 (m, 4H), 3,47 (dd, J = 15,4, 7,7 Hz, 1H), 2,90 (dd, J = 15,5, 6,4 Hz, 1H), 1,09 - 0,94 (m, 2H), 0,05 (s, 9H).

A una solución del compuesto **12** (500 mg, 1,065 mmol) en THF (3 ml) a 0 °C se le añadió NEt<sub>3</sub> (0,742 ml, 5,32 mmol). Se añadió cloroformiato de alilo **12a** (513 mg, 4,26 mmol) gota a gota. La solución resultante se agitó a 0 °C durante 2 h. La reacción se diluyó con MeOH (5 ml) y LiOH ac. (2 ml, 2 N). La mezcla resultante se agitó a TA durante 16 h. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice ISCO (columna de 24 g, 0-10 % de MeOH/DCM) para proporcionar compuesto **13** en forma de un sólido de color blanco (440 mg, 0,795 mmol, rendimiento del 74,6 %). CLEM (M+H) = 554,2. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,38 - 7,30 (m, 3H), 7,27 - 7,21 (m, 2H), 6,96 (s, 1H), 6,28 (s, 1H), 6,02 - 5,89 (m, 1H), 5,44 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 5,35 (dc, J = 17,2, 1,5 Hz, 1H), 5,26 (dc, J = 10,4, 1,3 Hz, 1H), 5,10 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 4,40 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,31 - 4,23 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,79 - 3,58 (m, 2H), 3,51 (dd, J = 15,6, 7,3 Hz, 1H), 2,96 (dd, J = 15,5, 6,4 Hz, 1H), 1,07 - 0,95 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

**Ejemplo 3 – Compuesto intermedio 19**

Este ejemplo y la Fig. 3 se refieren a las síntesis del compuesto 19, usado como un intermedio para la síntesis de dímeros de esta invención.

Se disolvió el cloruro ácido 1 en THF (30 ml) y se añadió gota a gota a una solución de carboxilato 14 (Buchstaller *et al.* US 2007/0191423 A1 (2007), 1,6 g, 5,21 mmol) y NEt<sub>3</sub> (2,9 ml, 20,8 mmol) en THF (20 ml) a 0 °C. La solución de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h antes de inactivarse con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, y después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. Después, la mezcla resultante se recogió en MeOH (50 ml). Se añadió carbonato potásico (1 g). La suspensión resultante se agitó a TA durante 1 h antes de filtrarse a través de una capa de CELITE™ y se concentró al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (220 g de columna, gradiente de EtOAc al de 0 % al 50 %/Hexano en 15 min) para dar el éster **15** (1,75 g, rendimiento del 68 %). CLEM (M+H) = 493,1.

Una suspensión del éster **15** (1,75 g, 3,55 mmol), zinc (1,394 g, 21,32 mmol), y NH<sub>4</sub>Cl (2,281 g, 42,6 mmol) en MeOH (10 ml) y se calentó a 50 °C durante una noche. Después la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de CELITE™, lavándose con MeOH al 20 %/DCM. El filtrado se concentró para dar el compuesto **16** (1,25 g, 2,90 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM (M+H) = 431,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,25 (s, 1H), 9,26 (s, 1H), 7,53 - 7,32 (m, 5H), 7,24 (s, 1H), 7,07 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,71 - 6,60 (m, 2H), 5,08 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,83 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,22 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,08 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,16 (dd, J = 15,4, 6,8 Hz, 1H), 2,85 (dd, J = 15,1, 6,3 Hz, 1H).

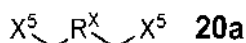
A una solución del compuesto **16** (1,25 g, 2,90 mmol) en DCM (40 ml) se le añadió *p*-toluenosulfonato de piridinio (PPTS, 0,073 g, 0,290 mmol) y tetrahidropirano (THP, 2,84 ml, 29,0 mmol). La reacción se agitó a TA durante una noche y después se inactiva con NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. La mezcla resultante se extrajo con DCM (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna EtOAc al 0-100 %/Hexano) para dar el compuesto **17** en forma de un sólido de color blanco (1,15 g, 2,235 mmol, rendimiento del 77 %). CLEM (M+H) = 515,3.

A una solución enfriada del compuesto **17** (1,2 g, 2,332 mmol) en DMF (10 ml) se le añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 0,168 g, 2,80 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 15 min y después, se calentó a TA y se agitó durante 10 min antes de que se enfriara de nuevo hasta 0 °C. Después se añadió SEM-C1 (0,496 ml, 2,80 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min antes de que se dejara calentar a TA y se agitó durante 1 h. Después, la reacción se interrumpió con salmuera. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, EtOAc al 0-50 %/Hexano) para dar el compuesto **18** (875 mg, 1,357 mmol, 58,2 %). CLEM (M+H) = 645,5. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,48 - 7,41 (m, 2H), 7,39 - 7,28 (m, 4H), 7,24 (s, 1H), 7,19 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,02 - 6,92 (m, 2H), 5,51 - 5,32 (m, 2H), 5,20 (s, 2H), 5,12 (dd, J = 15,3, 3,2 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 9,8, 1,7 Hz, 1H), 4,33 (dd, J = 15,3, 5,2 Hz, 1H), 4,22 (ddd, J = 7,4, 6,5, 4,3 Hz, 1H), 3,91 (s, 4H), 3,76 - 3,56 (m, 3H), 3,47 (dd, J = 15,4, 7,7 Hz, 1H), 2,92 (dd, J = 15,4, 6,4 Hz, 1H), 2,03 - 1,92 (m, 1H), 1,88 - 1,81 (m, 2H), 1,74 - 1,57 (m, 3H), 0,97 (ddd, J = 9,7, 6,8, 2,6 Hz, 2H), 0,09 - 0,01 (m, 9H).

Una suspensión del compuesto **18** (875 mg, 1,357 mmol) y Pd/C (10 %, 87 mg) en EtOAc (10 ml) se agitó en un globo de H<sub>2</sub> durante 2 h. Después, se filtró la mezcla de reacción a través de una capa de CELITE™ y se concentró al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, EtOAc al 0-100 %/Hexano) para dar el compuesto **19** en forma de un sólido de color blanco (485 mg, 0,874 mmol, rendimiento del 64,4 %). CLEM (M+H) = 555,1. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,33 (d, J = 0,7 Hz, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,04 - 6,95 (m, 2H), 6,01 (s, 1H), 5,46 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 5,44 - 5,34 (m, 1H), 5,16 (dd, J = 15,3, 2,6 Hz, 1H), 4,71 (dd, J = 9,7, 1,8 Hz, 1H), 4,35 (dd, J = 15,3, 4,5 Hz, 1H), 4,25 (ddd, J = 7,7, 6,4, 4,0 Hz, 1H), 4,01 - 3,87 (m, 4H), 3,80 - 3,59 (m, 3H), 3,52 (dd, J = 15,5, 7,8 Hz, 1H), 2,95 (dd, J = 15,5, 6,4 Hz, 1H), 2,05 - 1,96 (m, 1H), 1,92 - 1,82 (m, 2H), 1,77 - 1,62 (m, 3H), 1,06 - 0,97 (m, 2H), 0,05 (s, 9H).

**Ejemplo 4 – Dímeros simétricos THIQ-THIQ**

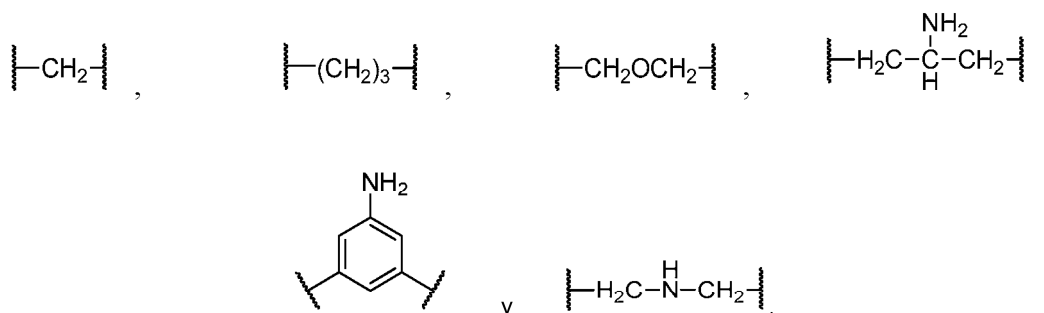
La Fig. 4 muestra un esquema genérico para hacer dímeros THIQ-THIQ simétricos. El puente que conecta las dos mitades del monómero deriva del compuesto **20a**.



Los grupos X<sup>5</sup> son grupos salientes, tales como I, Br, Cl, mesilato y tosilato. El grupo R<sup>x</sup> permite la variabilidad estructural en el puente. Los expertos en la materia apreciarán que, en ciertos casos, los grupos funcionales en R<sup>x</sup> pueden necesitar ser protegidos y desprotegidos según sea necesario durante el curso de la síntesis. Los grupos a



modo de ejemplo  $R^x$  incluyen:



- 5 Aunque el esquema de la **Fig. 4** tiene aplicabilidad general, el anillo aromático en el sistema THIQ mg se ha representado como no sustituido en aras de la simplicidad. Los expertos en la materia entenderán que puede soportar sustituyentes como se define anteriormente.

10 Siguiendo el concepto de la **Fig. 4**, se sintetizó el compuesto (**Ila-02**) como sigue a continuación.

- Una suspensión del compuesto 6 (50 mg, 0,11 mmol) y 1,5-diiodopentano (17,8 mg, 0,055 mmol) y  $K_2CO_3$  (15,2 mg, 0,11 mmol) en DMF (1 ml) se agitaron a TA durante 14 h. Después, la mezcla de reacción se diluyó con  $H_2O$  y se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  y se concentraron al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (12 g de columna, gradiente de MeOH de 0 % al 10 %/DCM en 15 minutos) para dar el compuesto **21** donde cada  $R^9$  es H (22 mg, rendimiento del 21 %). CLEM (M+H) = 977,8.

- A una solución del producto de la reacción precedente (22 mg, 0,023 mmol) en THF/EtOH (1:1, 1 ml) se le añadió una solución de LiBTU en THF (2 M, 116  $\mu$ l, 0,232 mmol) a 0 °C. La reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante 15 min antes de inactivarse con salmuera. La mezcla resultante se extrajo con cloroformo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  y se concentraron al vacío. Después, el producto en bruto se recogió en EtOH/cloroformo (1:1,2 ml). Se añadió gel de sílice (700 mg), seguido de agua (0,6 ml). La suspensión resultante se agitó a TA durante 24 h y después se filtró, lavándose con MeOH al 10 %/cloroformo. El filtrado se concentró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna  $Cl_8$  20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA); Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con ácido TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-70 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-02**) (7,5 mg, 9,86  $\mu$ mol, rendimiento del 43,8 %) CLEM M+H = 685,2. RMN  $^1H$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (s, 2H), 7,49 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,42 - 7,31 (m, 8H), 6,82 (s, 2H), 5,03 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 4,58 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,26 - 4,04 (m, 4H), 4,00 - 3,92 (m, 8H), 3,37 - 3,25 (m, 2H), 3,21 - 3,10 (m, 2H), 2,02 - 1,90 (m, 4H), 1,70 (d, J = 7,3 Hz, 2H).

Siguiendo el esquema general de la **Fig. 4**, se sintetizaron dímeros THIQ-THIQ simétricos adicionales:

- (a) Dímero (**Ila-01**) a partir del compuesto 6 y 1,3-dibromopropano: CLEM M+H = 657,2. RMN  $^1H$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (s, 2H), 7,49 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,42 - 7,30 (m, 8H), 6,87 (s, 2H), 5,03 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 4,58 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,31 (tdd, J = 9,6, 6,1, 3,6 Hz, 4H), 3,95 (s, 6H), 3,94 (s, 2H), 3,37 - 3,24 (m, 2H), 3,21 - 3,10 (m, 2H), 2,44 (t, J = 6,1 Hz, 2H).
- (b) Dímero (**Ila-07**) a partir del compuesto 6 y 1-yodo-2-(2-yodoetoxi)etano: CLEM M+H = 687,2. RMN  $^1H$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (s, 2H), 7,49 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,40 - 7,31 (m, 8H), 6,86 (s, 2H), 5,02 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,58 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,36 - 4,18 (m, 4H), 4,07 - 4,00 (m, 4H), 3,97 - 3,92 (m, 8H), 3,35 - 3,24 (m, 2H), 3,22-3,12 (m, 2H).
- (c) Dímero (**Ila-08**) a partir del compuesto 13 y 1,5-diiodopentano: CLEM M+H = 883,3. RMN  $^1H$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (s, 2H), 7,49 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,44 - 7,33 (m, 6H), 6,81 (s, 2H), 6,69 (s, 2H), 6,00 (dd, J = 17,1, 10,5 Hz, 2H), 5,40 (dd, J = 17,3, 1,4 Hz, 2H), 5,30 (dd, J = 10,5, 1,2 Hz, 2H), 5,01 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 4,71 (d, J = 5,5 Hz, 4H), 4,53 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 3,96 (s, 6H), 3,31 - 3,19 (m, 2H), 3,17 - 3,06 (m, 2H), 1,97 (s a, 4H), 1,75 - 1,66 (m, 2H).

#### Ejemplo 5 - Compuesto (**Ila-05**)

- 50 Este ejemplo y la **Fig. 4a** se refiere a la síntesis del compuesto (**Ila-05**) ((6aS',6a'S)-3,3'-(((5-amino-1,3-fenileno)bis(metileno))bis(oxi))bis(2-metoxi-6a,7-dihidrobenzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-b]isoquinolin-14(12H)-ona)), siguiendo de nuevo el esquema sintético general de la **Fig. 4**, pero que conlleva un ciclo de protección-desprotección como se muestra:  
Una suspensión de 5-nitro-m-xileno- $\alpha,\alpha$ -diol 24a (Aldrich, lg, 5,46 mmol) y Pd/C (291 mg, 0,273 mmol) en MeOH

(50 ml) se agitó en un globo de H<sub>2</sub> durante 2 horas a TA. La reacción se filtró a través de CELITE™ y se concentró al vacío. El 5-amino-1,3-fenileno)dimetanol **24b** en bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CLEM (M+H) = 154.

- 5 A una suspensión de dimetanol **24b** (600 mg, 3,92 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (650 mg, 4,7 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se le añadió cloroformiato de alilo **12a** (0,5 ml, 4,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min antes de dejarse calentar hasta TA y se agitó a TA durante 3 h. Después, la reacción se interrumpió con agua y se extrajo con EtOAc (2 x). La capa orgánica se secó y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, gradiente de EtOAc de 0 % al 100 %/DCM en 15 min) para dar carbamato de alilo **24c** (200 mg, rendimiento del 21,5 %). CLEM (M+23) = 261. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,31 (s, 2H), 6,91 (s, 1H), 5,99 (ddt, J = 17,2, 10,6, 5,4 Hz, 1H), 5,36 (dc, J = 17,2, 1,6 Hz, 1H), 5,24 (dc, J = 10,6, 1,4 Hz, 1H), 5,13 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 4,60 (dt, J = 5,4, 1,3 Hz, 2H), 4,44 (d, J = 5,5 Hz, 4H).

- 15 Una suspensión del carbamato de alilo anterior (462,5 mg, 1,949 mmol) y trietilamina (0,815 ml, 5,85 mmol) en DCM (20 ml) se enfrió a -10 °C y se trató con cloruro de metanosulfonilo (Ms-Cl, 0,395 ml, 5,07 mmol). La capa orgánica se lavó con agua enfriada con hielo, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar dimetanosulfonato **24d** (750 mg, rendimiento del 95 %). CLEM (M+H) = 394. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,52 (s, 2H), 7,15 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,09 - 5,87 (m, 1H), 5,39 (dd, J = 17,2, 1,5 Hz, 1H), 5,29 (dd, J = 10,3, 1,3 Hz, 1H), 5,21 (s, 4H), 4,69 (dt, J = 5,7, 1,2 Hz, 2H), 3,02 (s, 6H).

- 20 Una solución de dimetanosulfonato **24d** (135 mg, 0,343 mmol) en dimetilsulfóxido (DMSO, 16 ml) se trató con el compuesto **6** (312 mg, 0,686 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (142 mg, 1,029 mmol) a TA durante 2 h. La reacción se interrumpió con agua y se extrajo con EtOAc (3 x). La mezcla se secó y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, gradiente de EtOAc de 0 % al 100 %/Hexano en 15 min) para dar el carbamato **24e** (250 mg, rendimiento del 66 %). CLEM (M+1) = 1110. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,51 (s, 2H), 7,38 - 7,13 (m, 14H), 6,96 - 6,75 (m, 1H), 6,12 - 5,86 (m, 1H), 5,48 (d, J = 10,1 Hz, 2H), 5,43 - 5,32 (m, 1H), 5,32 - 5,23 (m, 1H), 5,23 - 4,99 (m, 6H), 4,74 - 4,53 (m, 4H), 4,41 (d, J = 15,2 Hz, 2H), 4,30 (d, J = 0,9 Hz, 2H), 3,96 - 3,83 (m, 6H), 3,81 - 3,46 (m, 6H), 2,98 (s, 2H), 1,14 - 0,85 (m, 4H), 0,13 - 0,08 (m, 18H).

- 30 A una solución del carbamato **24e** (200 mg, 0,180 mmol) en THF (5 ml) a 0 °C se le añadieron Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (8,33 mg, 7,20 μmol) y morfina (0,038 ml, 0,432 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se inactivó con cloruro de amonio ac. sat. (5 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml). La capa orgánica se lavó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ac. saturado, y después NaCl ac. saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, gradiente de Metanol de 0 % al 10 %/DCM en 15 minutos) para dar el compuesto **24f** (160 mg, rendimiento del 87 %). CLEM (M+1) = 1026. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,38 - 7,30 (m, 6H), 7,28 (d, J = 5,1 Hz, 7H), 6,92 - 6,85 (m, 1H), 6,76 (d, J = 1,1 Hz, 2H), 5,47 (d, J = 10,1 Hz, 2H), 5,18 (d, J = 15,2 Hz, 2H), 5,08 (d, J = 8,6 Hz, 4H), 4,65 (d, J = 10,1 Hz, 2H), 4,42 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,30 (d, J = 0,9 Hz, 2H), 3,92 (s, 6H), 3,82 - 3,50 (m, 8H), 3,09 - 2,94 (m, 2H), 1,11 - 0,88 (m, 4H), 0,10-0,03 (m, 18H).

- 40 A una solución a 0 °C del compuesto **24f** (22 mg, 0,021 mmol) en THF (233 μl) y EtOH (233 μl) se le añadió una solución de LiBH<sub>4</sub> (214 μl, 0,429 mmol, 2M en THF). La reacción se calentó lentamente a TA y se agitó a TA durante 2 h. La reacción se interrumpió con agua y se extrajo con cloroformo (2x), después cloroformo/MeOH (2 x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en cloroformo/EtOH/agua (1:1:1, 2 ml), se añadió gel de sílice (0,7 g), y la reacción se agitó durante 3 días a TA. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™, lavándose con cloroformo y la solución se concentró. El residuo se purificó por HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-80 % durante 20 min; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-05**), aislado en forma de un sólido de color amarillo claro (8,1 mg, rendimiento del 46,3 %). CLEM (M+1) = 734. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,57 (s, 1H), 7,47 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,43 - 7,30 (m, 4H), 6,99 - 6,79 (m, 1H), 6,73 (s, 1H), 5,40 - 4,90 (m, 4H), 4,59 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,17 - 3,85 (m, 4H), 3,39 - 3,05 (m, 2H).

#### Ejemplo 6 – Reducción de dobles enlaces de imina

- 55 Este ejemplo describe la preparación de diversos dímeros THIQ-THIQ con uno o ambos enlaces de imina reducidos.

En la primera sección de este ejemplo, los dímeros preparados fueron (**Ila-03**) e (**Ila-04**).

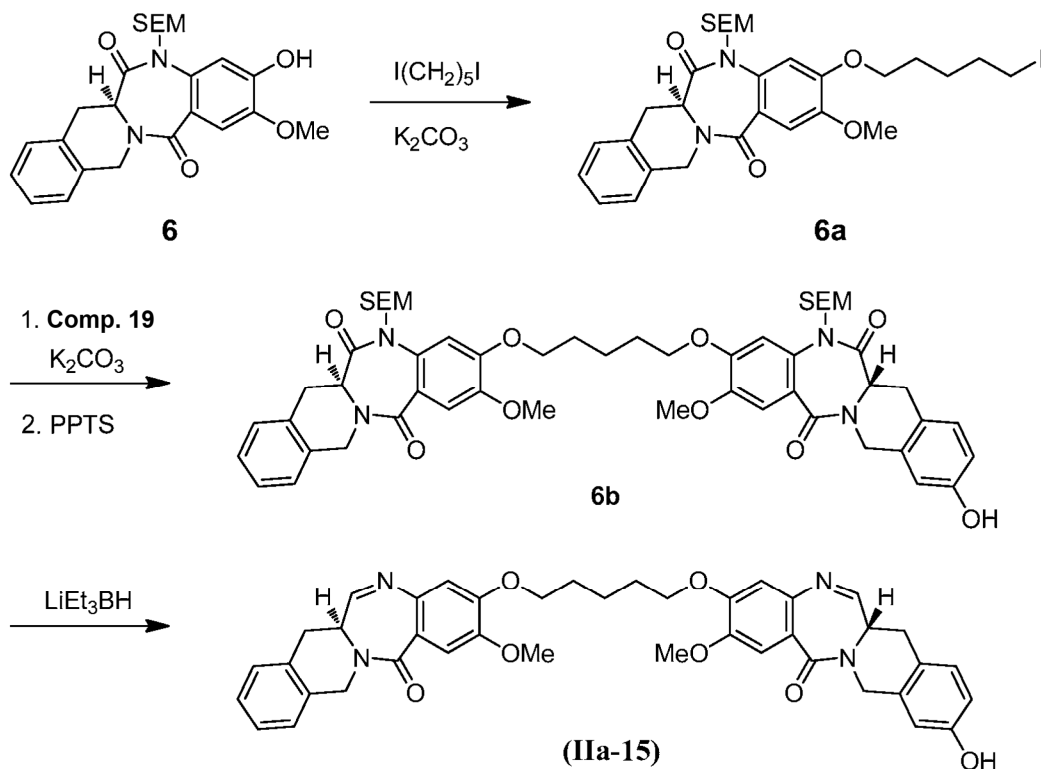
- 60 A una solución del dímero (**Ila-01**) (6 mg, 9,14 μmol) en THF (0,7 ml) a 0 °C se le añadió NaBH<sub>4</sub> (0,691 mg, 0,018 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 40 min antes de inactivarse con agua. La mezcla se extrajo con cloroformo (3 x). Las capas orgánicas se combinaron y se concentraron al vacío. Los dímeros (**Ila-03**) (CLEM (M+1): 659,1) y (**Ila-04**) (CLEM (M+1): 661,1) se separaron por HPLC de fase inversa (Columna : Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 15-60 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm).

En la siguiente sección de este ejemplo, se preparó (6aS',6a'5)-3,3'-(pentano-1,5- diilbis(oxi))bis(2-metoxi-5,6,6a,7-tetrahidrobenzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-b]isoquinolin- 14(12H)-ona) (**IIa-06**): A una solución del dímero (**IIa-02**) (28 mg, 0,041 mmol) en THF/MeOH (1:1, 1 ml) se le añadió NaBH<sub>4</sub> (1,548 mg, 0,041 mmol). La reacción se agitó a TA durante 2 h. Se añadió un segundo lote de NaBH<sub>4</sub> (1,548 mg, 0,041 mmol) y la reacción se agitó a TA durante una noche. Después, la reacción se interrumpió con agua y se extrajo con DCM. Las capas orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-80 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el compuesto (**IIa-06**) (4,2 mg, 5,49 µmol, rendimiento del 13,41 %; CLEM (M+1): 689,2).

#### Ejemplo 7 – Dímeros THIQ-THIQ asimétricos

Este ejemplo se refiere a la síntesis de dímeros THIQ-THIQ asimétricos. La **Fig. 5** muestra un esquema general para sus síntesis. Los grupos R<sup>E</sup> y R<sup>E'</sup> en la figura pueden ser diversos sustituyentes como se define anteriormente en el presente documento.

La primera sección de este ejemplo se refiere a la síntesis del dímero (A)-10-hidroxi- 2-metoxi-3-((5-(((A)-2-metoxi-14-oxo-6a,7,12,14-tetrahidrobenzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-b]isoquinolin-3-il)oxi)pentil)oxi)-6a,7-dihidrobenzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-b]isoquinolin-14(12H)-ona (**IIa-15**), para el siguiente esquema de reacción:



A una suspensión del compuesto **6** (250 mg, 0,550 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (304 mg, 2,200 mmol) en DMSO (5 ml) se le añadió 1,5-diiodopentano (891 mg, 2,75 mmol). La reacción se agitó a TA durante 2 h antes de diluirse con EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (12 g de columna, gradiente de MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el compuesto **6a** en forma de un aceite de color amarillo (275 mg, 0,423 mmol, rendimiento del 77 %). CLEM: (M+H) = 651,2 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,33 - 7,24 (m, 5H), 7,21 (s, 1H), 5,50 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,15 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,66 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 4,41 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,33 - 4,25 (m, 1H), 4,05 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,80 (td, J = 9,6, 6,9 Hz, 1H), 3,72 - 3,62 (m, 1H), 3,56 (dd, J = 15,5, 7,4 Hz, 1H), 3,22 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,00 (dd, J = 15,6, 6,4 Hz, 1H), 1,98 - 1,80 (m, 4H), 1,67 - 1,54 (m, 2H), 0,98 (ddd, J = 9,8, 6,7, 2,9 Hz, 2H), 0,04 (s, 9H).

A una solución del compuesto **6a** (135 mg, 0,208 mmol) y compuesto **19** (110 mg, 0,198 mmol) en DMSO (3 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (82 mg, 0,595 mmol). La suspensión resultante se agitó a TA durante 5 h. La reacción después se diluyó con EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El residuo se recogió en MeOH (10 ml). Se añadió PPTS (~15 mg) y la reacción se agitó a 40 °C durante 1 h. Después, la reacción se concentró y se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (EtOAc al 0-100 %/Hexano,

24 g de columna) para dar el compuesto **6b** (141 mg, 0,142 mmol, rendimiento del 71,6 %). CLEM (M+H) = 993,7. RMN (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,36 - 7,29 (m, 4H), 7,27 - 7,24 (m, 1H), 7,23 - 7,10 (m, 4H), 6,94 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 6,79 (dd, J = 8,1, 2,4 Hz, 1H), 5,51 (t, J = 9,6 Hz, 2H), 5,18 (dd, J = 19,4, 15,2 Hz, 2H), 4,69 (dd, J = 9,9, 7,5 Hz, 2H), 4,42 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,37 - 4,26 (m, 2H), 4,22 (dd, J = 7,7, 6,6 Hz, 1H), 4,09 - 4,00 (m, 3H), 3,88 (d, J = 2,6 Hz, 6H), 3,80 (dd, J = 7,0, 4,6 Hz, 2H), 3,68 (dd, J = 6,8, 5,1 Hz, 2H), 3,60 - 3,43 (m, 2H), 3,10 - 2,82 (m, 2H), 2,00 - 1,87 (m, 4H), 1,69 (s a, 2H), 0,98 (td, J = 6,6, 3,3 Hz, 4H), 0,10 - 0,02 (m, 18H).

A una solución del compuesto **6b** (18 mg, 0,018 mmol) en THF (0,6 ml) a -78 °C se le añadió una solución de trietilborohidruro de litio (1 M en THF, 362  $\mu$ l, 0,362 mmol). La reacción se agitó a -78 °C durante 1 h antes de interrumpirse con agua (1 ml). Después, la reacción se extrajo con cloroformo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío. Después, el residuo se recogió en cloroformo/EtOH (1:1,2 ml). Se añadió gel de sílice (0,8 g), seguido de agua (0,6 ml). La suspensión resultante se agitó a TA durante 1 día y después se filtró, lavándose con MeOH al 10 %/cloroformo. El filtrado se concentró al vacío y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-80 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-15**) (4,8 mg, 6,16  $\mu$ mol, rendimiento del 34,0 %). CLEM (M+H) = 701,2.

La síntesis del dímero (S)-2,10-dimethoxy-3-((5-((S)-2-metoxi-14-oxo-6a,7,12,14-tetrahydrobenzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-b]isoquinolin-3-il)oxi)pentil)oxi)-6a,7-dihidrobenzo[5,6][1,4]diazepina[1,2-b]isoquinolin-14(12H)-ona (**Ila-12**) a partir del compuesto **6b** se realizó como sigue a continuación. El compuesto **6b** se alquiló con yodometano usando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, para dar el producto metoxi correspondiente. CLEM (M+H) = 1007,6. La reducción con LiEt<sub>3</sub>BH siguiendo generalmente el procedimiento descrito anteriormente, dio el dímero (**Ila-12**). CLEM (M+H) = 715,3 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 7,50 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,41 - 7,30 (m, 5H), 6,94 - 6,86 (m, 2H), 6,81 (m, 1H), 5,01 (t, J = 14,9 Hz, 2H), 4,67 - 4,47 (m, 2H), 4,24 - 4,01 (m, 5H), 3,96 (s, 6H), 3,86 (s, 3H), 3,34 - 3,02 (m, 4H), 2,02 - 1,88 (m, 4H).

Siguiendo los procedimientos anteriores, haciendo los cambios necesarios, se sintetizaron dímeros THIQ-THIQ asimétricos adicionales:

(a) (**Ila-13**): CLEM (M+H) = 758,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,55 (d, J = 2,2 Hz, 2H), 7,49 (dd, J = 5,3, 3,4 Hz, 2H), 7,42 - 7,33 (m, 5H), 6,95 - 6,89 (m, 2H), 6,86 - 6,77 (m, 2H), 6,54 (s a, 1H), 5,57 (s a, 1H), 5,02 (dd, J = 15,5, 10,9 Hz, 2H), 4,62-4,56 (m., 2H), 4,20-4,02 (m, 6H), 3,96 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,90 - 3,84 (m, 3H), 3,31 - 3,05 (m, 5H), 1,96 (m, 4H).

(b) (**Ila-14**): CLEM (M+H) = 803,3.

(c) (**Ila-17**): CLEM (M+H) = 745,2.

### Ejemplo 8 – Dímeros con puente asimétrico

Este ejemplo y la Fig. 6 ilustran una estrategia sintética para hacer dímeros en los que el puente que une las dos mitades del dímero no es bilateralmente simétrico. La ilustración específica es con respecto al dímero (**Ila-09**).

A una solución de (2-hidroxietil)carbamato de bencilo **29** (Aldrich, 0,781 g, 4 mmol) y NEt<sub>3</sub> (1,115 ml, 8,00 mmol) se le añadieron cloruro de *p*-toluenosulfonilo (TsCl, 0,915 g, 4,80 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (EtOAc al 0-100 %/Hex, 40 g de columna) para dar el toluenosulfonato **30** (0,85 g, 2,43 mmol, rendimiento del 60,8 %). CLEM (M+H) = 350.

A una solución del compuesto **6** (160 mg, 0,352 mmol) y toluenosulfonato **30** (135 mg, 0,387 mmol) en DMF (3 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (97 mg, 0,704 mmol). La suspensión resultante se agitó a TA durante 2 h. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó secuencialmente con LiCl ac. y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 24 g de columna) para dar el compuesto **31**. CLEM (M+H) = 632,3.

Una suspensión del compuesto **31** y Pd al 10 %/C (25 mg) en MeOH (8 ml) se agitó en un globo de H<sub>2</sub> durante 5 h. Después, la reacción se purgó con N<sub>2</sub>, se filtró a través de una capa de CELITE™ y se concentró para dar el compuesto **32** (150 mg, 0,301 mmol, rendimiento del 86 %). CLEM (M+H) = 498 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,65 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,38 - 7,23 (m, 4H), 7,21 (s, 1H), 7,07 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,90 - 6,64 (m, 3H), 5,41 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 5,14 (d, J = 15,3 Hz, 1H), 4,76 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 4,44-4,33 (m, 2H), 4,32-4,17 (m, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,72 - 3,50 (m, 4H), 3,39 - 3,30 (m, 2H), 3,05 - 2,93 (m, 1H), 0,98 - 0,87 (m, 2H), 0,00 (s, 9H).

A una solución del compuesto **32** (65 mg, 0,131 mmol) en DCM (2 ml) a 0 °C se le añadieron NEt<sub>3</sub> (0,055 ml, 0,39 mmol) y cloruro de 2-cloroacetilo **32a** (22,13 mg, 0,196 mmol). La solución se agitó durante 1 h y después se diluyó con DCM. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El residuo se combinó con el compuesto **6** (59,4 mg, 0,131 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,2 mg, 0,392 mmol) y se suspendió en DMSO (1 ml). La mezcla resultante se calentó a 50 °C durante 4 h. Después de enfriar a TA, la reacción se diluyó con

EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 24 g de columna) para dar la acetamida **33** (95 mg, 0,096 mmol, rendimiento del 73,3 %). CLEM (M+H) = 992,5.

- 5 A una solución de la acetamida **33** (40 mg, 0,040 mmol) en THF (0,6 ml) a  $-78^\circ\text{C}$  se le añadió una solución de  $\text{LiEt}_3\text{BH}$  (0,4 ml, 1 M en THF). Después, la reacción se agitó a  $-78^\circ\text{C}$  durante 1 h antes de interrumpirse con agua (1 ml). Después, la mezcla de reacción se extrajo con cloroformo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron al vacío. Después, el residuo se recogió en cloroformo/EtOH (1:1, 2 ml). Se añadió gel de sílice (0,8 g), seguido de agua (0,6 ml). La suspensión resultante se agitó a TA durante 1 día y después se filtró, lavándose con MeOH al 10 %/cloroformo. El filtrado se concentró al vacío y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 15-70 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-09**) (11 mg, 0,014 mmol, rendimiento del 35,1 %). CLEM (M+H) = 700,2 RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,57 (d, J = 9,5 Hz, 2H), 7,48 (dd, J = 5,3, 0,9 Hz, 2H), 7,40 - 7,31 (m, 9H), 6,83 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 5,01 (d, J = 15,6 Hz, 2H), 4,64 - 4,51 (m, 4H), 4,20 (td, J = 9,4, 5,0 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,91 - 3,82 (m, 4H), 3,34 - 3,23 (m, 2H), 3,20 - 3,11 (m, 2H).

### Ejemplo 9 – Dímeros THIQ-PBD

- 20 El esquema general de la **Fig. 5** puede usarse para preparar dímeros THIQ-PBD, con una de las dos unidades de monómero THIQ reemplazadas por una unidad de monómero PBD. La unidad de monómero THIQ puede alquilarse primero y después la unidad de monómero PBD unida, o viceversa.

- 25 Este ejemplo y las **Figs. 7a y 7b** ilustran la síntesis de dímeros THIQ-PBD, con referencia específica a los dímeros (**Ilb-01**) y (**Ilb-02**).

La preparación del dímero (**Ilb-01**) se describe primero. El esquema sintético se resume en la **Fig. 7a** y ejemplifica el enfoque en el que el THIQ se alquila primero.

- 30 Una suspensión del compuesto **6a** (Ejemplo 7 anterior, 50 mg, 0,077 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (31,9 mg, 0,231 mmol) y la diona **35** (n.º de reg. CAS 132391-70-9, Howard *et al.* 2014c, 40,3 mg, 0,154 mmol) en DMF (1,5 ml) se calentó a  $50^\circ\text{C}$  durante 2 h. La reacción se enfrió a TA y se interrumpió con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (24 g de columna, MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el compuesto **36**. CLEM (M+H) = 785,4.

- 35 Se disolvió el compuesto **36** en DMF (0,5 ml). La solución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  antes de que se añadieran secuencialmente NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 3,07 mg, 0,077 mmol) y SEM-C1 (0,014 ml, 0,077 mmol). La reacción se calentó a TA y se agitó durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió con agua, se extrajo con EtOAc, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío. Se usó el compuesto **37** en bruto en la siguiente etapa sin purificación adicional (14 mg, 0,015 mmol, rendimiento del 20 %). CLEM (M+H) = 915,7.

- 40 A una solución del compuesto **37** en bruto (14 mg, 0,015 mmol) en THF/EtOH (1:1, 1 ml) a  $0^\circ\text{C}$  se le añadió una solución de  $\text{LiBH}_4$  (101  $\mu\text{l}$ , 0,202 mmol, 2 M en THF). La reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante 15 min antes de interrumpirse con salmuera. La mezcla resultante se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (3 x). La capa orgánica se separó, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío. Después, el residuo se recogió en EtOH/cloroformo (1:1, 2 ml). Se añadió gel de sílice (700 mg), seguido de agua (0,6 ml). La suspensión resultante se agitó a TA durante 1 día y después se filtró, lavándose con MeOH al 10 %/ $\text{CHCl}_3$ . El filtrado se concentró y se purificó por HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de  $\text{CH}_3\text{CN}$ :agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 15-60 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar (**Ilb-01**) (0,92 mg, 1,330  $\mu\text{mol}$ , rendimiento del 8,69 %). CLEM (M+H) = 623. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,69 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,57 - 7,53 (m, 2H), 7,50 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,41 - 7,32 (m, 4H), 6,82 (d, J = 1,5 Hz, 2H), 5,03 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,59 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,18 - 4,06 (m, 4H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,75 (d, J = 7,3 Hz, 4H), 3,61 (dt, J = 11,8, 7,8 Hz, 1H), 3,34 - 3,26 (m, 1H), 3,22 - 3,15 (m, 1H), 2,34 (s a, 2H), 2,11 - 2,06 (m, 1H), 2,01 - 1,94 (m, 4H), 1,71 - 1,66 (m, 2H).

Volviendo ahora a la síntesis del dímero (**Ilb-02**), el esquema sintético se resume en la **Fig. 7b**. En este caso, es la unidad de monómero PBD que se alquila primero y después se acopla a la unidad de monómero THIQ.

- 60 A una solución del compuesto **9** (220 mg, 0,512 mmol) en MeOH (3 ml) y THF (3 ml) se le añadieron formaldehído (solución ac. al 37 %, 0,572 ml, 7,68 mmol) y unas gotas de ácido acético. La solución se agitó a TA durante 10 min antes de añadirse  $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$  (129 mg, 2,049 mmol). Después, la reacción se agitó a TA durante 2 h antes de concentrarse al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 24 g de columna) para dar el compuesto **38a** (230 mg, 0,503 mmol, rendimiento del 98 %). CLEM (M+H) = 458.

A una solución del compuesto **38a** (230 mg, 0,503 mmol) en DMF (5 ml) a 0 °C se le añadió NaH (dispersión al 60 % en aceite mineral, 25,1 mg, 0,628 mmol). La mezcla se agitó durante 15 min antes de añadirse SEM-C1 (0,111 ml, 0,628 mmol). La reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante una noche. Después, la reacción se interrumpió con agua y se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el compuesto **38b**. CLEM (M+H) = 588,2.

Se combinó el compuesto **38b** con Pd al 10 %/C (20 mg) y se suspendió en EtOH/EtOAc (1:1, 10 ml). La mezcla se purgó con N<sub>2</sub> y después se agitó en un globo de H<sub>2</sub> durante 4 h. Después, la reacción se filtró a través de una capa de CELITE™ y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 40 g de columna) para dar el compuesto **38c** (190 mg, 0,382 mmol, rendimiento del 76 %). CLEM (M+H) = 498,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,45 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,18 - 7,10 (m, 1H), 6,69 (m, 2H), 5,51 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 5,12 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,65 (d, J = 10,1 Hz, 1H), 4,33 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,24 (d, J = 0,4 Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,79 (s, 1H), 3,72 - 3,63 (m, 1H), 3,52 - 3,40 (m, 1H), 2,93 (s, 6H), 1,05 - 0,89 (m, 2H), 0,03 (s, 9H).

Se preparó el compuesto **38d** siguiendo generalmente los procedimientos descritos anteriormente. CLEM (M+H) = 393,4. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,38 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 6,34 (s, 1H), 5,46 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,19 - 4,06 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,80 - 3,60 (m, 3H), 3,60 - 3,53 (m, 1H), 3,50 (d, J = 2,9 Hz, 2H), 2,78 - 2,68 (m, 1H), 2,19 - 1,95 (m, 3H), 1,05 - 0,96 (m, 2H), 0,08 - 0,02 (m, 9H).

A una solución del compuesto **38d** (1,2 g, 3,06 mmol) en DMF (10 ml) se le añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,268 g, 9,17 mmol) y 1,5-dhodopentano (5,94 g, 18,34 mmol). La reacción se agitó a TA durante 2 h antes de interrumpirse con agua. La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (24 g de columna, MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el compuesto **38e** (1,52 g, 2,58 mmol, rendimiento del 84 %). CLEM (M+H) = 589,1

A una solución del compuesto **38e** (22,12 mg, 0,038 mmol) y el compuesto **38c** (17 mg, 0,034 mmol) en DMSO (1 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,44 mg, 0,068 mmol). La mezcla resultante se agitó a TA durante 14 h. La reacción después se diluyó con EtOAc y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 24 g de columna) para dar el compuesto **38f** (27 mg, 0,028 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM (M+H) = 958,3.

El compuesto **38f** se convirtió en el dímero (**Ila-02**) mediante reducción, siguiendo generalmente los procedimientos descritos anteriormente. CLEM (M+H) = 666,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,68 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 7,52 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 6,73 - 6,65 (m, 2H), 4,97 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,53 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,29 - 4,03 (m, 4H), 3,96 (s, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,84 (ddd, J = 11,7, 7,1, 4,5 Hz, 1H), 3,78 - 3,72 (m, 1H), 3,66 - 3,56 (m, 1H), 3,28 - 3,17 (m, 1H), 3,06 (dd, J = 15,4, 4,2 Hz, 1H), 3,01 - 2,95 (m, 6H), 2,34 (td, J = 6,7, 3,0 Hz, 2H), 2,16 - 1,90 (m, 6H), 1,78 - 1,62 (m, 3H).

#### Ejemplo 10 – Dímeros THIQ-THIQ (**Ila-10**) y (**Ila-11**)

Este ejemplo y la Fig. 8 se refieren a la preparación de dímeros (**Ila-10**) y (**Ila-11**).

A una solución del compuesto **6a** (100 mg, 0,154 mmol) y el compuesto **13** (68 mg, 0,123 mmol) en DMSO (3 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50,9 mg, 0,368 mmol). La suspensión resultante se agitó a TA durante 5 h. La reacción después se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 12 g de columna) para dar el carbamato **39** (124 mg, 0,115 mmol, rendimiento del 94 %). CLEM (M+H) = 1076,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,30 (d, J = 0,9 Hz, 6H), 7,27 - 7,18 (m, 5H), 6,89 (s, 1H), 6,01 - 5,88 (m, 1H), 5,49 (dd, J = 9,9, 4,0 Hz, 2H), 5,34 (dd, J = 17,3, 1,4 Hz, 1H), 5,25 (dd, J = 10,3, 1,1 Hz, 1H), 5,18 - 5,04 (m, 2H), 4,71 - 4,62 (m, 4H), 4,40 (d, J = 15,4 Hz, 2H), 4,32 - 4,22 (m, 2H), 4,09 - 3,97 (m, 4H), 3,90 - 3,84 (m, 6H), 3,82 - 3,73 (m, 2H), 3,71 - 3,44 (m, 5H), 3,08 - 2,90 (m, 2H), 1,99 - 1,90 (m, 4H), 1,04 - 0,91 (m, 4H), 0,02 (s, 9H), 0,02 (s, 9H).

A una solución del carbamato **39** (124 mg, 0,115 mmol) en DCM (6 ml) a 0 °C se le añadió morfolina (0,080 ml, 0,922 mmol). Después de la reacción se purgó con N<sub>2</sub>, se añadió Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (13,31 mg, 0,012 mmol). La reacción se calentó lentamente a TA y se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 h. Después, la reacción se concentró y se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM) para dar el compuesto de anilina correspondiente (90 mg, 0,091 mmol, rendimiento del 79 %). CLEM (M+H) = 992,5.

A una solución del compuesto de anilina precedente (89 mg, 0,090 mmol) en THF (3 ml) a -78 °C se le añadió LiEt<sub>3</sub>BH (1 M en THF, 0,448 ml, 0,448 mmol). La reacción se agitó a -78 °C durante 1 h. Después, la reacción se interrumpió con agua (1 ml) y se extrajo con cloroformo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron al vacío. Después, el residuo se recogió en cloroformo/EtOH (1:1,2 ml). Se

añadió gel de sílice (0,7 g), seguido de agua (0,6 ml). La suspensión resultante se agitó a TA durante 1 día y después se filtró, lavándose con MeOH al 10 %/cloroformo. El filtrado se concentró y se purificó sobre HPLC (Columna: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-70 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-10**) (19 mg, 0,024 mmol, rendimiento del 27,2 %). CLEM (M+H) = 700,2 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,54 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 7,50 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 7,41 -7,31 (m, 5H), 7,15 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 6,73 - 6,59 (m, 2H), 5,02 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,58 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,22 - 4,03 (m, 3H), 4,00 - 3,70 (m, 9H), 3,34 - 3,25 (m, 1H), 3,18 (dt, J = 15,4, 4,2 Hz, 2H), 3,09 - 3,00 (m, 1H), 2,03 - 1,92 (m, 4H), 1,76 - 1,63 (m, 2H).

A una solución del dímero (**Ila-10**) (4,5 mg, 6,43 μmol), Fmoc-GLY-OH (Chem-Impex, 3,82 mg, 0,013 mmol) y hexafluorofosfato de *N,N,N,N'*-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU, 4,89 mg, 0,013 mmol) en DMF (0,5 ml) se le añadió *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA, 3,37 μl, 0,019 mmol). La reacción se agitó a TA durante 4 h antes de añadirse piperidina (100 μl). La mezcla resultante se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción en bruto después se diluyó con DMF, se filtró y se purificó sobre HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-70 % durante 20 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero (**Ila-11**) (0,94 mg, 1,180 μmol, rendimiento del 18,35 %). CLEM (M+H) = 757,2.

### Ejemplo 11 – Dímero THIQ-PBD (**Ilb-03**)

Este ejemplo y la **Fig. 9** se refiere a la preparación del dímero THIQ-PBD (**Ilb-03**).

El compuesto **41** se preparó generalmente siguiendo los procedimientos en los ejemplos previos. CLEM (M+H) = 409,1 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,32 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,30 (s, 1H), 5,45 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 9,8 Hz, 1H), 4,65 (s a, 1H), 4,30 (dd, J = 7,9, 5,9 Hz, 1H), 4,00 - 3,84 (m, 4H), 3,79 - 3,57 (m, 3H), 2,97 (dt, J = 13,5, 5,5 Hz, 1H), 2,86 (s a, 1H), 2,21 - 2,08 (m, 1H), 1,00 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 0,03 (s, 9H).

A una solución de la diona **41** (500 mg, 1,224 mmol) en DMSO (3 ml) se le añadió el 1,3-dibromopropano **42** (1730 mg, 8,57 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (423 mg, 3,06 mmol). La reacción se agitó a TA durante 3 h. Después, la reacción se interrumpió con agua y se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 40 g de columna) para dar bromopropoxi PBD **43** (540 mg, 0,918 mmol, 75 %) en forma de una espuma de color blanco. CLEM (M+H) = 531,2.

A una solución de monómero THIQ **19** (100 mg, 0,180 mmol), preparada generalmente siguiendo los procedimientos de los ejemplos precedentes, y bromopropoxi PBD **43** (117 mg, 0,198 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (62,3 mg, 0,451 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 16 h. La reacción después se diluyó con EtOAc y se lavó secuencialmente con agua y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentró. La mezcla resultante se recogió en MeOH (10 ml) y se añadió PPTS (20 mg). La reacción se agitó a 40 °C durante 1 h. La reacción se concentró, se recogió en EtOAc, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> ac. y después, salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (EtOAc al 0-20 %/Hexano, 24 g de columna) para dar el compuesto **45** (150 mg, 0,163 mmol, rendimiento del 91 %). CLEM: (M+H) = 919,3

A una solución del compuesto **45** (150 mg, 0,163 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadieron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (67,7 mg, 0,490 mmol) y yodometano (46,3 mg, 0,326 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 16 h. La reacción después se diluyó con EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto **46** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CLEM (M+H) = 933,5.

A una solución a 0 °C del producto en bruto **46** (150 mg, 0,161 mmol) en DCM (804 μl) y DMSO (804 μl) se le añadió trietilamina (112 μl, 0,804 mmol) seguido de complejo de trióxido de azufre y piridina (51,2 mg, 0,321 mmol). La reacción se dejó calentar a TA y se agitó durante 16 h. La reacción después se diluyó con DCM (30 ml), se lavó secuencialmente con NH<sub>4</sub>Cl ac. sat. (10 ml), H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml) y NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (10 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida ISCO sobre gel de sílice (24 g de columna; gradiente EtOAc al 0-100 %-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar la cetona **47** (112 mg, 0,084 mmol, rendimiento del 52,4 %). CLEM (M+H) = 930,5.

A una solución de la cetona **47** (112 mg, 0,120 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió 2,6-lutidina (0,028 ml, 0,241 mmol). Después, la solución se enfrió hasta -78 °C. Después, se añadió gota a gota anhídrido tríflico (0,030 ml, 0,180 mmol). La reacción se calentó lentamente hasta 0 °C y se agitó durante 2 h. Después, la reacción se interrumpió con salmuera y se extrajo con DCM. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-10 %/DCM, 24 g de columna) para dar el triflato **48** (81 mg, 0,076 mmol, rendimiento del 63,3 %). CLEM (M+H) = 1062.

A un vial con tapa de rosca se le añadieron el triflato **48** (81 mg, 0,076 mmol), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina **48a** (20,03 mg, 0,091 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (2,79 mg, 3,81  $\mu$ mol). El vial se evacuó y se volvió a llenar con N<sub>2</sub>. THF (2 ml) y se añadió una solución de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ac. (1 M, 0,38  $\mu$ l, 0,38 mmol). La mezcla se agitó en atmósfera de N<sub>2</sub> a 45 °C durante 2 h. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con salmuera. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó usando Cromatografía ultrarrápida ISCO sobre gel de sílice (12 g de columna; gradiente lineal EtOAc al 0-100 %-Hex) para proporcionar el compuesto **49** (53 mg, 0,053 mmol, rendimiento del 69,1 %). CLEM (M+H) = 1006,3. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d)  $\delta$  7,41 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,29 - 7,20 (m, 6H), 6,91 - 6,80 (m, 2H), 6,68 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 5,51 (dd, J = 11,9, 10,0 Hz, 2H), 5,13 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,75 (dd, J = 16,8, 10,0 Hz, 2H), 4,60 (dd, J = 10,6, 3,4 Hz, 1H), 4,39 (d, J = 15,3 Hz, 1H), 4,33 - 4,21 (m, 5H), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,80 - 3,74 (m, 3H), 3,69 (tdd, J = 9,5, 7,2, 5,0 Hz, 2H), 3,51 (dd, J = 15,5, 7,5 Hz, 1H), 3,12 (ddd, J = 16,1, 10,6, 2,1 Hz, 1H), 3,03 - 2,87 (m, 1H), 2,44 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 1,03 - 0,92 (m, 4H), 0,04 (s, 9H), 0,03 (s, 9H).

A una solución del compuesto **49** (7 mg, 6,96  $\mu$ mol) en THF (1 ml) a -78 °C se le añadió gota a gota una solución de trietilborohidruro de litio (0,070 ml, 0,070 mmol, 1 M en THF). La reacción se agitó a -78 °C durante 1 h antes de interrumpirse con salmuera. La mezcla se extrajo con MeOH al 10 %/cloroformo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío. El residuo se recogió en THF/EtOH (1:1, 2 ml). Se añadió ácido fórmico acuoso (0,05 %, 1 ml). Después, la reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> ac. y se extrajo con cloroformo (3 x). Las capas orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron usando cromatografía ultrarrápida ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-6 %/DCM, 4 g de columna) para dar el dímero (**Ib-03**) (2,1 mg, 2,65  $\mu$ mol, rendimiento del 38,1 %). CLEM (M+H) = 714,0.

#### Ejemplo 12 – Dímeros (**Ila-16**) y (**Ila-18**)

Este ejemplo y las **Figs. 10** y **11** se refieren a la síntesis de dímeros que tienen un grupo amina en el puente que conecta las dos mitades del dímero, siendo dicho grupo amina un grupo funcional adecuado para la unión de un enlazador. (Véanse los compuestos de enlace dímero tipo (a), discutidos en el presente documento anteriormente).

El esquema para la síntesis del dímero (**Ila-16**) ((6aS,6a'S)-3,3'-((azanediilbis-(etano-2,1-diil))bis(oxi))bis(2-metoxi-6a,7-dihidrobenczo[5,6][1,4]diazepino[1,2-b]isoquinolin-14(12H)-ona)) se mostró en la **Fig. 10**.

A una suspensión de 2,2'-azanediildietanol 50 (5 g, 47,6 mmol, Fluka) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,57 g, 47,6 mmol) en acetonitrilo (50 ml) a 0 °C se le añadió el cloroformiato de alilo **12a** (5,07 ml, 47,6 mmol) y se agitó a TA durante 3 h. La CLEM mostró la formación del producto. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se interrumpió con agua (200 ml), y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró para proporcionar el carbamato **51** (2,55 g, 13,48 mmol, rendimiento del 28,3 %) en forma de un aceite de color Amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,94 (m, 1H), 5,32 (dd, J = 17,6, 1,6 Hz, 1H), 5,24 (dd, J = 10,4, 1,2 Hz, 1H), 4,62 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 3,84 (d, J = 12,4 Hz, 2H), 3,52 (s, 2H), 2,86 (s, 2H). CLEM: [M+1] = 190,1.

A una solución del carbamato **51** (600 mg, 3,17 mmol) y NEt<sub>3</sub> (1,768 ml, 12,68 mmol) en DCM (5 ml) a 0 °C se le añadió TsCl (1814 mg, 9,51 mmol) en DCM (5 ml) y se agitó a TA durante 1 h. La CLEM mostró la formación del producto. La solución de reacción se concentró y el producto en bruto se purificó sobre COMBIFLASH™ usando 80 g de columna de sílice y EtOAc al 0-70 %/hexano durante 25 min. El 70 % de la fracción proporcionó el **52** en forma de un aceite espeso (rendimiento del 54 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,78 (m, 4H), 7,38 (m, 4H), 5,82 (m, 1H), 5,22 (m, 2H), 4,48 (m, 2H), 4,13 (m, 4H), 3,52 (m, 4H), 2,47 (s, 6H). CLEM: [M+Na] = 520,1.

Una solución del compuesto **52** (39,8 mg, 0,080 mmol) y el compuesto **6** (80 mg, 0,176 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (33,2 mg, 0,240 mmol) en DMSO (1,5 ml) se agitó a 50 °C durante 19 h. La CLEM mostró un pico principal correspondiente al producto. La mezcla de reacción se vertió en agua que contenía AcOH (0,027 ml, 0,480 mmol, 30 ml). Se añadió salmuera saturada (10 ml) y se extrajo con EtOAc (3x15 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron sobre ISCO COMBIFLASH™ 24 g de columna usando EtOAc al 0-100 %/hexano durante 30 min. La fracción de EtOAc al 70 %/hexano proporcionó el compuesto **53** (rendimiento del 64 %). CLEM (m+1) = 1062,5.

A una solución del compuesto **53** (54 mg, 0,051 mmol) en THF (4 ml) se le añadieron morfina (0,022 ml, 0,254 mmol) y Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (2,94 mg, 2,54  $\mu$ mol) y se agitó en una atmósfera de nitrógeno a TA durante 2 h. La CLEM mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y se purificó sobre ISCO COMBIFLASH™ 24 g de columna usando MeOH al 0-8 %/DCM para proporcionar el compuesto **54** en forma de un sólido de color blanco (rendimiento del 64 %). CLEM: (m+1) = 978,5.

A una solución del compuesto **54** (35 mg, 0,036 mmol) en THF (4 ml) se le añadió LiEt<sub>3</sub>BH (0,179 ml, 0,179 mmol) a -76 °C. La solución se agitó durante 1 h. La CLEM mostró que la reacción se había completado. La reacción se interrumpió con agua fría (20 ml) y la mezcla de reacción se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3x10 ml). El residuo resultante se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1 = 4 ml) y gel de sílice (1 g) durante 4 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y el gel de sílice se lavó con CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:2, 100 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó sobre 24 g de columna de gel de sílice usando MeOH/DCM. La fracción al 20 % de MeOH/DCM



proporcionó el dímero (**Ila-16**) en rendimiento del 65 %. CLEM: (m+1) = 686,3.

El dímero (**Ila-18**) se preparó de manera análoga, partiendo de 2-amino-propanol-1,3-diol **55** y procedimiento a través de los compuestos **56**, **57**, **58** y **59**.

5

Compuesto **56**: aceite de color amarillo claro, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,94 (m, 1H), 5,50 (s a, 1H), 5,29 (m, 2H), 4,60 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 3,83 (m, 5H). CLEM (m+1) = 176.

Compuesto **57**: sólido de color blanco, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,78 (m, 4H), 7,38 (m, 4H), 5,88 (m, 1H), 5,25 (m, 2H), 5,02 (s a, 1H), 4,53 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 4,09 (m, 5H), 2,48 (s, 6H).

Compuesto **58**: EM (m+1) = 1048.

Compuesto **59**: CLEM (m+1) = 964,46.

Dímero (**Ila-18**): CLEM (m+1) = 672,3.

### Ejemplo 13 – Tipo (a) dímero-enlazador (**Illa-01**)

Este ejemplo y la **Fig. 12** describe la preparación de tipo (a) dímero-enlazador (**Illa-01**).

10

A un matraz de fondo Redondo de 100 ml se le añadieron Fmoc-Val-Cit **60** (Firestone *et al.* US 6.214.345 B1 (2001), Ejemplo 56, 363 mg, 0,731 mmol), HATU (278 mg, 0,731 mmol) y DMF (20 ml). La solución resultante se agitó a 0 °C durante 10 min antes de añadir 2,6-lutidina (0,113 ml, 0,97 mmol). La mezcla se añadió al compuesto **24f** (500 mg, 0,487 mmol). La mezcla de reacción se calentó lentamente a TA y se agitó durante 5 h. Después, la reacción se interrumpió con una solución al 10 % de LiCl y se extrajo con EtOAc (3 x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con LiCl al 10 % y después, salmuera, antes de secarse sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentrarse al vacío. La mezcla del producto en bruto se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, gradiente de MeOH de 0 % al 10 %/DCM en 15 minutos) para dar el compuesto **61a** (520 mg, rendimiento del 71 %). CLEM (M+1) = 1504. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,83 - 7,69 (m, 4H), 7,58 (s a, 2H), 7,45 - 7,17 (m, 16H), 7,15 - 6,93 (m, 1H), 5,45 (d, J = 10,1 Hz, 2H), 5,24 - 4,97 (m, 7H), 4,71 (d, J = 9,7 Hz, 5H), 4,56 - 4,02 (m, 8H), 3,87 (s, 6H), 3,79 - 3,49 (m, 8H), 3,03 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 1,77 (s, 7H), 1,09 - 0,82 (m, 11H), 0,10-0,10 (m, 18H).

15

20

A una solución del compuesto **61a** (580 mg, 0,385 mmol) en DMF (7,7 ml) se le añadió piperidina (191 µl, 1,927 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1 h. Después, la mezcla del producto en bruto se concentró y se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (40 g de columna, gradiente de MeOH de 0 % al 10 %/DCM en 15 minutos) para dar el compuesto **61b** (318 mg, rendimiento del 64 %). CLEM (M+1) = 1282.

25

A una solución a -78 °C del compuesto **61b** (200 mg, 0,156 mmol) en THF (4 ml) se le añadió una solución de LiEt<sub>3</sub>BH (0,780 ml, 0,780 mmol) (1M en THF). La reacción se agitó a -78 °C durante 2 h. La reacción se interrumpió con agua y se extrajo con cloroformo (2 x), después cloroformo/MeOH (2 x). Los extractos orgánicos combinados se secaron y se concentraron. Después, el residuo se recogió en cloroformo/EtOH/agua (1:1:1, 4 ml) y se añadió gel de sílice (0,7 g). La suspensión resultante se agitó a TA durante 3 días antes de filtrarse a través de un lecho de CELITE™, se lavó con cloroformo y se concentró. El material se recogió en DMF y se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto **62** (57 mg, rendimiento del 36,9 %). CLEM (M+H) = 990 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,62 - 7,50 (m, 2H), 7,50 - 7,25 (m, 12H), 6,88 - 6,68 (m, 1H), 5,33 - 4,67 (m, 6H), 4,66 - 4,29 (m, 3H), 4,02 - 3,69 (m, 6H), 3,47 - 2,84 (m, 6H), 2,46 - 1,74 (m, 2H), 1,59 (s a, 4H), 1,09 - 0,74 (m, 6H).

30

35

A una solución del compuesto **62** (23 mg, 0,023 mmol) y el compuesto **62a** (disponible como MAL-dPEG8-NHS® de QuantaBio; 32 mg, 0,046 mmol) en DMSO (1,4 ml) se le añadió 2,6-lutidina (5,41 µl, 0,046 mmol). La reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla del producto en bruto se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa (Columna: Luna Cl<sub>8</sub> 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1 %; Gradiente: B al 20-70 % durante 17 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub> MP de 500 mg (Agilent). El filtrado se recogió por gravedad y la columna se lavó con 4 ml de ACN. Los filtrados combinados se concentraron y se liofilizaron para dar dímero-enlazador (**Illa-01**) (3 mg, rendimiento del 35,8 %). CLEM (M+1) = 1564.

40

45

### Ejemplo 14 – Tipo (a) dímero-enlazador (**Illa-02**)

Este ejemplo y la **Fig. 13** describe la preparación de tipo (a) dímero-enlazador (**Illa-02**).

50

A una solución del carbonato **63** (3,92 mg, 3,50 µmol, preparación descrita en el presente documento a continuación) y el dímero (**Ila-16**) (2 mg, 2,92 µmol) en DMSO (0,2 ml) se le añadió DIEA (1,528 µl, 8,75 µmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. La purificación por R-HPLC usando acetonitrilo/agua (ácido fórmico al 0,05 %) durante 30 min produjo fracciones que contenían el producto, que se filtraron a través de una resina básica (PL-HCO<sub>3</sub> MP -Resina 1,8 mmol/g; Agilent Part n.º PL3540-C603) y se lavó con acetonitrilo (5 ml). La liofilización dio el dímero-enlazador (**Illa-02**) en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 52 %. CLEM (m+1) = 1666.

55

Los expertos en la materia apreciarán que los procedimientos para preparar compuestos enlazadores de dímero de tipo (a) en este y en el ejemplo anterior pueden adaptarse para hacer otros compuestos enlazadores de dímero de tipo (a), haciendo los cambios necesarios.

## 5 **Ejemplo 15 – Compuestos tipo (b) dímero-enlazador**

Este ejemplo y las **Figs. 14-16** se refieren a la preparación de los compuestos **73** y **74**, usados en la síntesis de compuestos del tipo (b) de dímero-enlazador, y la preparación de tales compuestos de dímero-enlazador a partir de ellos.

10 Se cargó un matraz con ácido 5-metoxi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)oxi)benzoico **64** (n.º de reg. de CAS 1430738-03-6, 9,0 g, 24,36 mmol) y HATU (10,19 g, 26,8 mmol) en DCM (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min y se trató con DIEA (4,68 ml, 26,8 mmol) e isoquinolina **15** (n.º de reg. de CAS 215928-81-7, 7,43 g, 26,8 mmol). La reacción se mantuvo a 0 °C durante 3 h y después se agitó a TA durante 24 h. La mezcla de  
15 reacción se vertió en NH<sub>4</sub>Cl saturado y DCM. La fase orgánica se recogió y se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se purificó adicionalmente por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10 % -30 % en hexanos. El producto se recogió y se concentró para proporcionar la amida **66** en forma de un aceite de color castaño claro (10,15 g, rendimiento del 66 %). CLEM M+H = 629,65.

20 Una solución de amida **66** (10,1 g, 16,06 mmol) se enfrió en MeOH (200 ml) a 0 °C y se añadieron NH<sub>4</sub>Cl (4,29 g, 80 mmol) y polvo de cinc (5,25 g, 80 mmol). La suspensión de color verde resultante se agitó a 0 °C durante 45 min, después se dejó calentar a TA durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de CELITE™ (lavado con MeOH) y el filtrado se concentró hasta obtener un residuo. El residuo se recogió en DCM y se cargó en un lecho de gel de sílice. Esto se lavó abundantemente con EtOAc al 50 % y hexanos para proporcionar anilina **67**  
25 (8,02 g, rendimiento del 83 %). CLEM M+H = 599,35.

Se disolvió anilina **67** (2500 mg, 4,17 mmol) en DCM (50 ml) y se añadió piridina (0,878 ml, 10,85 mmol). La mezcla se enfrió a -78 °C y se añadió cloroformiato de alilo **12a** (0,579 ml, 5,43 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a esta temperatura durante 1 h y después se dejó calentar a TA. La mezcla de reacción se vertió en NH<sub>4</sub>Cl saturado y  
30 DCM. La mezcla se extrajo con DCM y se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10 %-50 % en hexanos para proporcionar carbamato **68** (2,5 g, rendimiento del 88 %). CLEM M+H = 683,40.

El carbamato **68** (1,372 g, 2,009 mmol) se disolvió en MeOH (20 ml). Se añadió HCl concentrado al 10 % en MeOH (2 ml, 6,58 mmol). La mezcla se envejeció durante 20 min y se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> (0,591 g, 7,03 mmol) en agua. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo 4 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La purificación por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-50 %/Hexanos proporcionó alcohol **69** (963 mg, rendimiento del 84 %). CLEM M+H = 569,25.

Se disolvió cloruro de oxalilo (2,0 M, 1,450 ml, 2,90 mmol) en DCM (30 ml) y después la mezcla se enfrió a -78 °C en un baño de hielo seco/acetona. A esto se le añadió DMSO (0,515 ml, 7,25 mmol, disuelto en ~2 ml de DCM para evitar la congelación durante la adición) y la temperatura se mantuvo a -78 °C. Después de 20 min, se añadió alcohol **69** (1,65 g, 2,90 mmol) disuelto en DCM (10 ml) a la reacción. Esto se dejó agitar durante 30 min adicionales y después se añadió NEt<sub>3</sub> (2,022 ml, 14,50 mmol). Después de 10 min la reacción se dejó calentar a TA. Esto se interrumpió con NH<sub>4</sub>Cl saturado y se extrajo con DCM (2 veces). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron hasta obtener un residuo. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 30 %-100 % en hexanos. El producto se recogió y se concentró para proporcionar aminal **70** en forma de un sólido de color blanco (1,51 g, rendimiento del 92 %). CLEM M+H = 567,30. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ 7,39 - 7,24 (m, 5H), 7,22 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 5,75 (dd, J = 11,2, 5,6 Hz, 1H), 5,31 (dd, J = 9,5, 4,0 Hz, 1H), 5,22 - 5,07 (m, 2H), 4,84 (d, J = 15,8 Hz, 1H), 4,64 - 4,49 (m, 2H), 4,44 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,77 - 3,61 (m, 1H), 3,28 - 3,01 (m, 3H), 1,34 - 1,18 (m, 3H), 1,09 (dd, J = 7,4, 2,6 Hz, 18H).  
50

Se disolvió aminal **70** (776 mg, 1,369 mmol) en DCM (12 ml) y se añadió 2,6-lutidina (0,638 ml, 5,48 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (TBSOTf, 0,943 ml, 4,11 mmol). La mezcla se envejeció durante 30 min, se diluyó con DCM, se inactivó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo 2 veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-30 %/hexanos para proporcionar silil éter **71** (907,6 mg, 1,333 mmol, rendimiento del 97 %). La RMN-<sup>1</sup>H mostró que el material purificado estaba contaminado con -0,25 equivalentes de 2,6-lutidina (-4 % en peso), pero se usó sin ninguna purificación adicional. CLEM M+H = 681,25.

60 Se disolvió silil éter **71** (907 mg, 1,332 mmol) en DMF (5 ml) y agua (0,1 ml). Se añadió acetato de litio (88 mg, 1,332 mmol) y la mezcla se envejeció durante la noche. La mayor parte de la DMF se evaporó con una corriente de nitrógeno. El resto se diluyó con EtOAc, se lavó 2 veces con ácido cítrico 0,1 M y después una vez con salmuera. Las fases orgánicas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El resto se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 30-70 %/hexanos para proporcionar fenol **72** (707,4 mg, 1,107 mmol, rendimiento del 83 %) que contenía algo de EtOAc por RMN-<sup>1</sup>H (aprox. 1,3 equiv.;  
65

rendimiento ajustado para tener en cuenta el EtOAc). CLEM M+H = 525,10.

Se disolvió el fenol **72** (290 mg, 0,553 mmol) en acetona (2800 µl) y se añadieron carbonato de cesio (180 mg, 0,553 mmol) y 1,5-diyodopentano (400 µl, 2,69 mmol). El vial se cerró herméticamente y se calentó a 60 °C durante una noche. Después de la reacción se dejó proceder durante una noche, el disolvente se evaporó, y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La mezcla se extrajo dos veces, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para proporcionar un residuo en bruto que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-50 %/hexanos para proporcionar el compuesto **73** (381 mg, rendimiento del 96 %). CLEM M+H = 721,10.

El compuesto **74** se preparó de manera similar a partir del fenol **72** usando 1,3-diyodopropano.

Volviendo ahora al esquema de la **Fig. 15**: Compuesto **67**, se disolvió compuesto **17** (2,1 g, 3,51 mmol) en DCM (30 ml) y se añadió piridina (0,3 ml, 3,71 mmol). La mezcla se enfrió a 0 °C. Se añadió carbonocloridato de 4-nitrofenilo **67a** (0,707 g, 3,51 mmol) y la mezcla se envejeció durante 7 min a la misma temperatura. Se añadió una solución de compuesto **75** (n.º de reg de CAS 1343407-91-9, 1,323 g, 3,51 mmol) y DIEA (0,750 ml, 4,29 mmol) en DMF (3 ml). La mezcla se colocó en un evaporador rotativo a TA para retirar el DCM. Después de 20 min, el DMF se evaporó en una corriente de nitrógeno y después el resto se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 10-100 % en hexanos para proporcionar compuesto **76** (1,579 g, 1,575 mmol, rendimiento del 44,9 %). CLEM M+H = 1002,50.

Una solución del compuesto **76** (1,579 g, 1,575 mmol) en MeOH (14,4 ml) se trató con HCl concentrado al 10 % en MeOH (1,6 ml, 5,27 mmol). La mezcla se envejeció 30 min, se inactivó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y se extrajo con cloroformo (3 veces). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron para dejar un residuo. El residuo se combinó con otro lote de la misma reacción (comenzando con 0,816 g de compuesto **25**) para la purificación. Los residuos en bruto combinados se purificaron por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 20-100 %/Hexanos para proporcionar el carbamato **77** (1,7412 g, 1,961 mmol, rendimiento del 82 %). CLEM M+H = 888,30.

Una solución de cloruro de oxalilo (2,0 M, 1,00 ml, 2,000 mmol) en 10 ml de DCM se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota una solución de DMSO (0,348 ml, 4,90 mmol) en 5 ml de DCM y la mezcla se envejeció a la misma temperatura durante 10 min. Se añadió gota a gota una solución de carbamato **77** (1741,2 mg, 1,961 mmol) en 5 ml de DCM y la mezcla se envejeció nuevamente durante 15 min. Se añadió gota a gota NEt<sub>3</sub> (1,366 ml, 9,80 mmol); la mezcla se envejeció a la misma temperatura durante 5 min y después se retiró el baño frío y la mezcla se dejó calentar a TA. La mezcla se inactivó con solución de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo dos veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50-80 %/Hexanos para proporcionar compuesto **78** (1376,7 mg, 1,554 mmol, rendimiento del 79 %). CLEM M+H = 886,30.

El compuesto **78** (1045 mg, 1,179 mmol) se disolvió en DCM (10 ml) y se añadió 2,6-lutidina (0,549 ml, 4,72 mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBSOTf (0,813 ml, 3,54 mmol). Después de 1 h, la mezcla se diluyó con DCM, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 20-100 %/Hexanos. Se obtuvieron algunas fracciones mixtas, que se volvieron a purificar por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50 %/Hexanos (isocrático). Las fracciones puras se combinaron para proporcionar compuesto **79** (676,9 mg, 0,677 mmol, rendimiento del 57,4 %). CLEM M+H = 1000,30.

Una solución del compuesto **79** (676 mg, 0,676 mmol) en DMF (5 ml) y agua (0,1 ml) se trató con LiOAc (44,6 mg, 0,676 mmol). La mezcla se envejeció durante la noche y el disolvente se evaporó en una corriente de nitrógeno. El resto se repartió entre EtOAc y ácido cítrico 0,1 M. Las fases se separaron y las fases orgánicas se lavaron dos veces con ácido cítrico 0,1 M, una vez con salmuera y después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50-100 %/Hexanos para proporcionar compuesto **80** (543,6 mg, 0,644 mmol, rendimiento del 95 %). CLEM M+H = 844,35.

Volviendo ahora a la **Fig. 16**, muestra un esquema mediante el cual los compuestos intermedios previamente formados **73** y **80** se usaron para hacer dímero-enlazador (**IIb-01**).

Una solución del compuesto **73** (326 mg, 0,452 mmol) y el compuesto **80** (318 mg, 0,377 mmol) en acetona (1884 µl) se trató con carbonato de cesio (123 mg, 0,377 mmol). El vial que contenía la mezcla se cerró herméticamente y se calentó a 60 °C. Después de dejarse proceder la reacción durante una noche, la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con ácido cítrico 0,1 M y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 50-80 %/hexanos. Esto proporcionó el compuesto **81** (338 mg, 0,235 mmol, rendimiento del 62,4 %) contaminado con una impureza de elución próxima. La mezcla se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional (el rendimiento no está corregido para la pureza). CLEM M+H = 1436,65. HRMS encontrado M+H = 1436,6881, calculado = 1436,6916. HRMS para impureza de elución próxima M+H = 1378,6485.

A una solución del compuesto **81** (107 mg, 0,074 mmol, impuro de la etapa anterior) en THF (2 ml) se le añadió fluoruro de tetrabutil amonio (TBAF, 1,0 M, 0,16 ml, 0,160 mmol). La mezcla se dejó madurar durante 10 min, se diluyó con EtOAc, se lavó secuencialmente con agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera y después, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con MeOH al 1-10 %/DCM para proporcionar el compuesto **82** (71 mg, 0,059 mmol, rendimiento del 79 %), contaminado con una impureza de elución próxima (el rendimiento no está corregido para la pureza). CLEM M+Na = 1230,25. HRMS encontrado M+H = 1208,5170, calculado = 1208,5187. HRMS para impureza de elución próxima M+H = 1150,4755.

Se cargo un vial con el compuesto **82** (71 mg, 0,059 mmol, impuro a partir de la etapa previa) y se añadió una solución 0,042 M de pirrolidina en DCM (3,50 ml, 0,147 mmol), seguido de tetraquitrifenilfosfina paladio (4,07 mg, 3,53 µmol). La mezcla se mantuvo en reposo durante 1 h, se diluyó con DCM y se lavó con NH<sub>4</sub>Cl saturado. La porción acuosa se extrajo de nuevo con DCM, las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, la capa de salmuera se volvió a extraer de nuevo con DCM y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. El residuo se disolvió en DMF y se purificó por HPLC preparativa durante tres inyecciones (columna Sunfire C18 prep OBD 19x100 mm, Disolvente A = agua al 95 %, CAN al 5 % + TFA al 0,1 %, disolvente B = agua al 55 %, ACN al 95 % + TFA al 0,1 %; el gradiente es B al 0-100 % durante 10 min, con una parada a los 12 min, las fracciones se recogieron por UV a 254 nm). Las fracciones purificadas se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> MP SPE 500 mg/6 ml para proporcionar el producto como una base libre. La solución de la base libre se evaporó para dar el compuesto **83** (30 mg, 0,029 mmol, rendimiento del 49,9 %). CLEM M+H=1022,25.

Se cargo un vial con el compuesto **83** (18,10 mg, 0,059 mmol) seguido de DIEA 0,05 M en DMF (0,8 ml, 0,040 mmol). Esta mezcla se dejó reposar durante una noche, y después se diluyó con DMF (~0,4 ml) y se purificó por HPLC preparativa (1 inyección) (columna Sunfire C18 prep OBD 19x100 mm, Disolvente A = agua al 95 %, CAN al 5 % + TFA al 0,1 %, disolvente B = agua al 55 %, CAN al 95 % + TFA al 0,1 %; el gradiente es B al 0-100 % durante 10 min, con una parada a los 12 min, las fracciones se recogieron por UV a 254 nm). Las fracciones purificadas se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> MP SPE 500 mg/6 ml para proporcionar el dímero-enlazador (**IIlb-01**) (19,6 mg, 0,015 mmol, rendimiento del 52,2 %) como una base libre. CLEM M+H=1216. HRMS encontrado M+H=1215,5387, calculado = 1215,5397.

De manera análoga, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente, se prepararon compuestos dímero-enlazadores adicionales:

(a) Se usaron los compuestos **74** y **80** para preparar el dímero-enlazador (**IIlb-03**): CLEM M+H=1 187,20. HRMS encontrado M+H=1 187,5087, calculado = 1 187,5084.

(b) Se redujeron los dímero-enlazadores (**IIlb-01**) y (**IIlb-03**) con cianoborohidruro sódico para producir dímero-enlazadores (**IIlb-05**) (CLEM (M+2H)/2=609,55. HRMS encontrado M+H=1217,5561, calculado = 1217,5554) y (**IIlb-06**) (CLEM M+H=1189. HRMS encontrado M+H=1 189,5268, calculado = 1 189,5241), respectivamente.

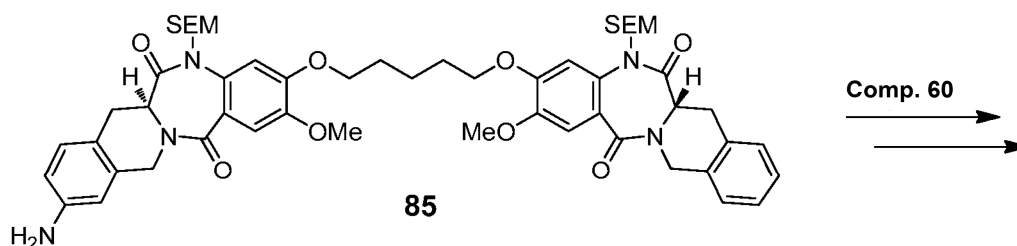
(c) Se convirtió el compuesto **83** en el dímero-enlazador (**IIlb-02**) acoplando con el compuesto **62a**: CLEM (M+2H)/2=799,25. HRMS encontrado M+H=1596,7390, calculado = 1596,7396.

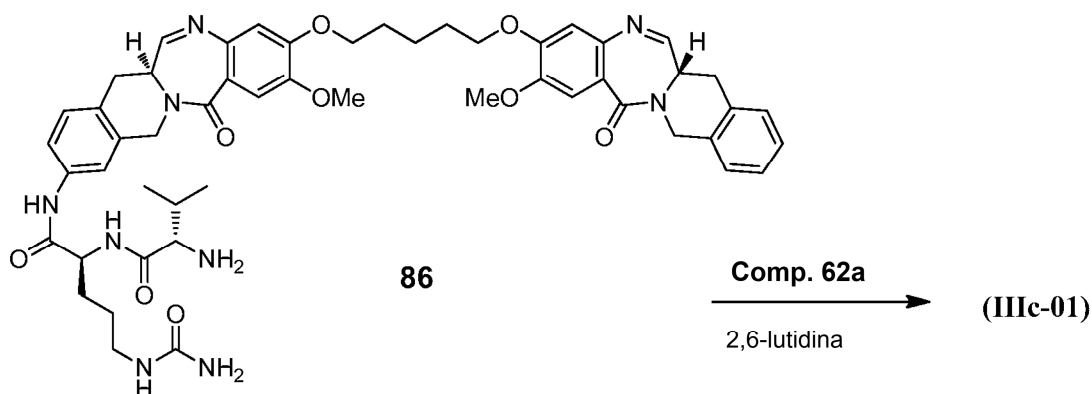
(d) Se convirtió el compuesto **81** en el dímero-enlazador (**IIlb-04**) reduciendo con tetraquitrifenilfosfina paladio y acoplándose con el compuesto **84**: CLEM M+H=1329. HRMS encontrado M+H=1329,6247, calculado = 1329,6262.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos de unión a dímero THIQ-PBD de tipo (b) pueden prepararse usando un equivalente de PBD del compuesto **73** o **74** o el compuesto **80** y de otra manera análogamente siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento.

#### Ejemplo 16 – Tipo (c) dímero-enlazadores

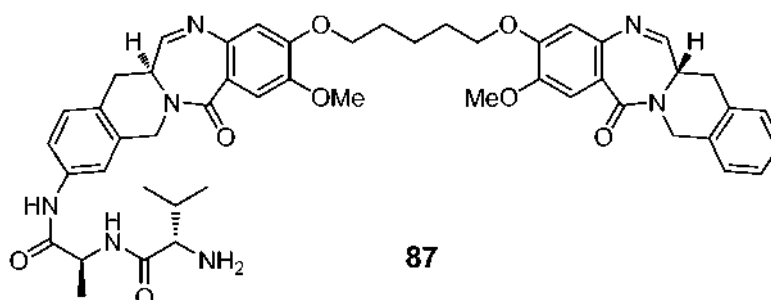
El compuesto **85**, preparados por la retirada del grupo Alloc a partir del compuesto **39** (Ejemplo 10) se acopló con el compuesto **60** y se convirtió al compuesto **86** de manera análoga siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento.





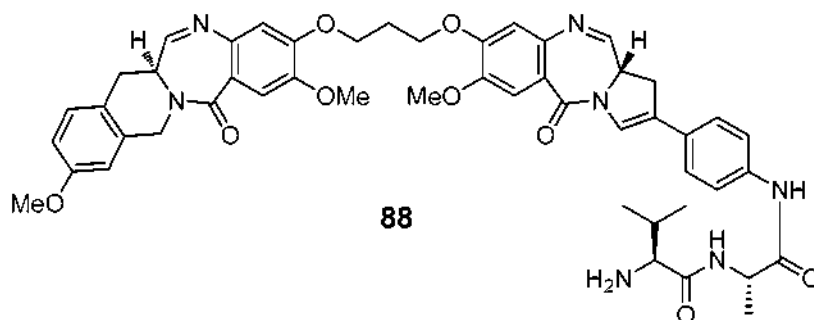
A una solución del compuesto **86** (9,6 mg, 10,04  $\mu\text{mol}$ ) y 2,6-dimetilpiridina (2,152 mg, 0,020 mmol) en DMSO (0,7 ml) se le añadió una solución de MAL-dPEG@8-NHS éster (13,85 mg, 0,020 mmol) en DMSO (100  $\mu\text{l}$ ). La reacción se agitó a TA durante 1 h. La solución después se diluyó con acetonitrilo, se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 0-70 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub> MP 500 mg (Agilent). El filtrado se recogió por gravedad y la columna se lavó con 4 ml de ACN. Los filtrados combinados se concentraron y se liofilizó para dar el dímero-enlazador (**IIIc-01**) (9,4 mg, 5,53  $\mu\text{mol}$ , rendimiento del 55,0 %). CLEM (M+H) = 1530.

El compuesto **87** (CLEM (M+2H) = 435,9) se preparó a partir del compuesto **85** de manera análoga siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en el presente documento, haciendo los cambios necesarios.



A una solución del compuesto **87** (5 mg, 5,75  $\mu\text{mol}$ ) y 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,949 mg, 6,32  $\mu\text{mol}$ ) en DMSO (0,2 ml) se le añadió 2,6-lutidina (1,339  $\mu\text{l}$ , 0,011 mmol). La reacción se agitó a TA durante 4 h. Después, la reacción se diluyó con DMF (1 ml), se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-80 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub> MP 500 mg (Agilent). El filtrado se recogió por gravedad y la columna se lavó con 4 ml de acetonitrilo. Los filtrados combinados se concentraron y se liofilizaron para dar el dímero enlazador (**IIIc-07**) (1,8 mg, 1,524  $\mu\text{mol}$ , rendimiento del 26,5 %). CLEM (M+H) = 1063,4.

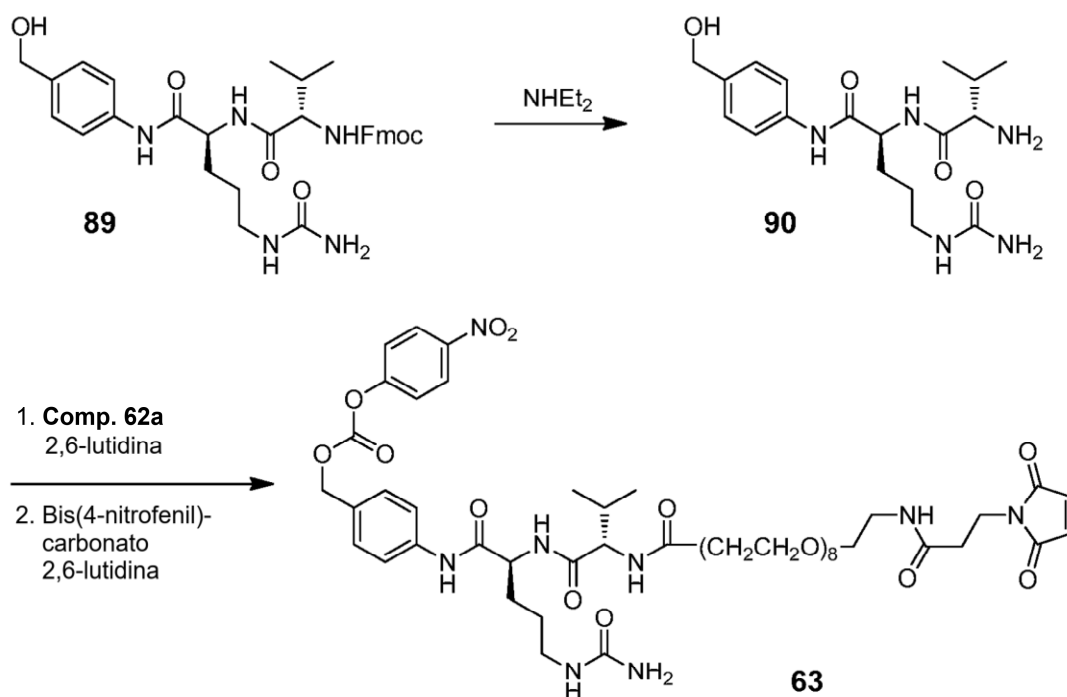
El compuesto **88** se preparó a partir del compuesto **49** de manera análoga siguiendo los procedimientos en el presente documento anteriormente. CLEM (M+H) = 884,7



A una solución del compuesto **84** (12,03 mg, 0,039 mmol) y el compuesto **88** (23 mg, 0,026 mmol) en DMSO (0,2 ml) se le añadió 2,6-lutidina (6,06 µl, 0,052 mmol). La reacción se agitó a TA durante 5 h y después se diluyó con DCM y se purificó usando cromatografía ISCO sobre gel de sílice (MeOH al 0-15 %/DCM, 12 g de columna). Después, las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para dar una espuma de color ligeramente amarillo, que se recogió en H<sub>2</sub>O/THF (2:1, 4 ml) y se liofilizó para dar un dímero-enlazador (**IIlc-08**) (9,5 mg, 7,94 µmol, rendimiento del 30,5 %). CLEM (M+H) = 1077,8.

#### Ejemplo 17 – Tipo (c) dímero-enlazadores con un grupo autoinmolante en el enlazador

Este ejemplo ilustra la preparación de compuestos dímero-enlazador en donde el dímero tiene un grupo autoinmolante PABC, tal como el dímero-enlazador (**IIlc-02**). El resto enlazador se ensambla como se muestra a continuación:



A una solución del compuesto **89** (Firestone *et al.* US 6,124,345 B1 (2001), Ejemplo 57; 0,75 g, 1,246 mmol) en DMF (2 ml) y THF (8 ml) se le añadió dietilamina (2,81 ml, 26,9 mmol). La reacción se agitó a TA durante 1,5 h y se concentró. El producto en bruto se trituró con DCM, se filtró y se secó al vacío para dar el compuesto **90** en forma de un sólido de color blanco. CLEM (M+H) = 380,2 RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,06 (s, 1H), 8,15 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,26 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 6,00 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,13 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 4,56 - 4,33 (m, 3H), 3,07 - 2,93 (m, 3H), 2,00 - 1,55 (m, 5H), 1,49 - 1,32 (m, 2H), 0,90 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,80 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

A una solución del compuesto **90** (79 mg, 0,209 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadió una solución de MAL-dPEG®8-NHS éster (120 mg, 0,174 mmol) en DMSO (1 ml), seguido de 2,6-lutidina (37,3 mg, 0,348 mmol). La reacción se agitó a TA durante 3 h. Se añadió una solución de bis(4-nitrofenil)carbonato (63,5 mg, 0,209 mmol) en DMF (2 ml), seguido de 2,6-lutidina (37,3 mg, 0,348 mmol). Después, la reacción se agitó a TA durante 12 h. Después, se añadió

DIPEA (0,061 ml, 0,348 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 3 h. La mezcla del producto en bruto se diluyó con DMF, se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 0-70 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el compuesto **63** (40 mg, 0,036 mmol, rendimiento del 20,54 %). CLEM (M+H) = 1119,5.

Al compuesto (**Ila-10**) (3,5 mg, 5,00  $\mu$ mol) se le añadió una solución del compuesto **91** (5,60 mg, 5,00  $\mu$ mol) en DMSO (0,16 ml), seguido de DIPEA (2,62  $\mu$ l, 0,015 mmol) y HOAt (0,6 mg, 5,00  $\mu$ mol). La reacción se agitó a TA durante 24 h y se diluyó con DMF, se filtró y se purificó usando HPLC de fase inversa (Columna: Phenomenex Luna C18 20x100 mm; Fase móvil A: 10:90 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: 90:10 de acetonitrilo:agua con TFA al 0,1 %; Gradiente: B al 20-80 % durante 15 minutos; Flujo: 20 ml/min; Detección: UV a 220 nm) para dar el dímero-enlazador (**IIlc-02**) (2,1 mg, 1,188  $\mu$ mol, rendimiento del 23,74 %) en forma de un sólido de color blanco. CLEM (M+H) = 1679,6.

De forma análoga, siguiendo los procedimientos anteriores, se prepararon compuestos dímero-enlazador adicionales que tienen un grupo autoinmolante:

(**IIlc-03**) CLEM (M+2H)/2 = 876,1.

(**IIlc-04**) CLEM (M+2H)/2 = 790,5.

(**IIlc-05**) CLEM (M+H) = 1650,9.

(**IIlc-06**) CLEM (M+H) = 1593,9.

Los expertos en la materia apreciarán que otros compuestos dímero-enlazador, tipo (c) o de otro tipo, que tienen grupos autoinmolantes PABC u otros, pueden prepararse de manera análoga, haciendo los cambios necesarios.

### Ejemplo 18 – Dímeros THIQ-AZI

Este ejemplo y la **Fig. 17** se refiere a la preparación de dímeros THIQ-AZI, en particular el dímero (**IIc-01**).

Se cargo una botella Parr con el compuesto **90a** (n.º de reg. CAS 1210045-50-3, 3,0 g, 8,27 mmol) e hidróxido de paladio sobre carbono (20 %, 50 % húmedo; 1,0 g, 0,712 mmol) suspendido en etanol (60 ml) y ácido acético (10 ml). Este se puso en el aparato Parr y se cargo con 0,38 MPa (55 psi) de hidrógeno. Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se filtró a través de CELITE™ y el filtrado se concentró para dejar un residuo. El residuo se diluyó con EtOAc y se lavó con saturado  $\text{NaHCO}_3$  saturado. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con EtOAc al 20 %-50 % en hexanos para proporcionar el producto racémico (2,49 g, rendimiento del 83 %) en forma de un aceite transparente. CLEM (M+H) = 365,55. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,44 - 8,16 (m, 2H), 7,79 - 7,42 (m, 1H), 4,48 (s, 1H), 3,74 (d, J = 6,5 Hz, 2H), 3,36 - 3,18 (m, 1H), 3,18 - 3,00 (m, 1H), 1,65 - 1,49 (m, 9H), 0,75 (s, 9H), 0,11 - 0,23 (m, 6H). This racemate se purificó adicionalmente por cromatografía SFC quiral (Lux Cellulose-2 21,2 x 250 mm, columna de 5  $\mu$ m, eluyendo con acetonitrilo al 30 % en  $\text{CO}_2$  a 14 MPa (140 bar) and 35 °C.) para proporcionar dos picos. El Segundo pico en eluir (isómero (-)) se recogió para proporcionar azaindolina **91** en forma de un aceite incoloro (1,01 g, rendimiento global del 34 %).

Se cargo un vial con la azaindolina **91** (850 mg, 2,332 mmol) en MeOH (4 ml). A esto se le añadió HCl 4 M en dioxano (8,5 ml, 34,0 mmol). La reacción se agitó a TA durante una noche. La mezcla de reacción se concentró hasta un residuo y después, se recogió en MeOH y éter. Este se concentró de nuevo (2 x) para proporcionar el residuo desprotegido. Este residuo se cargó en un matraz junto con acetonitrilo (1 ml). A esto se le añadieron cloruro de *tert*-butil-dimetilsililo (TBS-Cl, 446 mg, 2,96 mmol) e imidazol (671 mg, 9,86 mmol) y la reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado. La fase orgánica se lavó dos veces y después, se concentró hasta un residuo. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con 5 % ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10 %/MeOH) en cloroformo. El producto se recogió y se concentró hasta el compuesto **92** en forma de un aceite transparente. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8,00 - 7,84 (m, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,40 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 3,95 (dd, J = 9,9, 5,1 Hz, 1H), 3,54 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,05 (dd, J = 16,2, 9,9 Hz, 1H), 2,77 - 2,59 (m, 1H), 0,83 (s, 9H), 0,03 (d, J = 7,5 Hz, 6H).

Se cargo un vial con el compuesto **93** (n.º de reg. CAS 313644-41-6, 420 mg, 0,863 mmol) en 5 ml de DMF. A esto se le añadió HATU (821 mg, 2,159 mmol). Después de permanecer en reposo durante 30 min, se añadieron una solución del compuesto **65** (252 mg, 0,907 mmol) y del compuesto **92** (240 mg, 0,907 mmol) y DIPEA (0,754 ml, 4,32 mmol) en 2 ml de DMF. Después de permanecer en reposo durante una hora adicional, la mezcla se transfirió a un matraz que contenía ~100 ml de agua, y la mezcla se acidificó con HCl 1 N. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con agua. Los sólidos húmedos se recogieron, se disolvieron en DCM, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage) eluyendo con MeOH al 0-10 %/DCM para proporcionar tres productos. El pico de elución media fue la amida heterodimérica **94** (353,1 mg, 0,356 mmol, rendimiento del 41,2 %). CLEM (M+H) = 992,30.

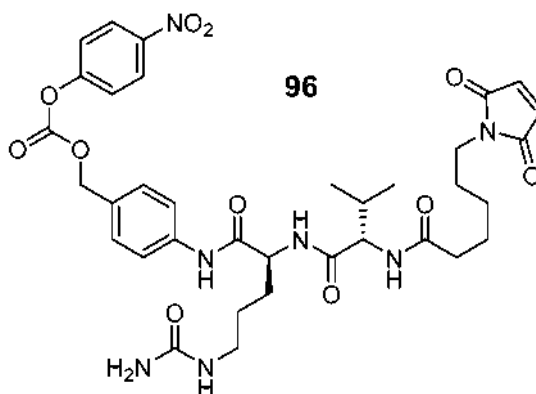
La amida **94** (200 mg, 0,202 mmol) se disolvió en THF (2 ml). A esto se le añadieron agua (200  $\mu$ l, 11,10 mmol) y

P(Me)<sub>3</sub> (605 µl, 0,605 mmol). Después de permanecer en reposo ~30 min, el disolvente se evaporó y la muestra se destiló azeotrópicamente con tolueno. El residuo se disolvió en DCM (10 ml). Se añadió piridina (0,08 ml, 1,00 mmol) y la mezcla se enfrió a -78 °C. Se añadió cloroformato de alilo **12a** (64,5 µl, 0,605 mmol) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 30 min y después, se dejó calentar a TA. La mezcla se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo dos veces con DCM, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se disolvió de nuevo en 7:1:1:2 de AcOH/THF/MeOH/agua (3 ml en total) y se agitó durante una noche. Debido a que la desprotección fue lenta, después de agitarse durante una noche, se añadieron 0,5 ml de HCl al 10 % en MeOH, dando como resultado la desprotección completa después de un adicional de 30 minutos. La mezcla de reacción se transfirió cuidadosamente en NaHCO<sub>3</sub> para neutralizarla. La mezcla se extrajo tres veces con DCM, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (Biotage), eluyendo con 3-6 % (NH<sub>4</sub>OH al 10 %/MeOH) en cloroformo. El pico principal se recogió para proporcionar el compuesto **95** (95,7 mg, 0,109 mmol, rendimiento del 54,0 %). CLEM (M+H) = 880,15.

Un matraz se cargó con DMSO (0,018 ml, 0,256 mmol) en 0,5 ml de DCM y se enfrió a -78 °C. Se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (0,061 ml, 0,123 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en reposo 10 minutos a la misma temperatura, momento en el cual se añadió gota a gota una solución del compuesto **95** (45 mg, 0,051 mmol) en 0,5 ml de DCM. Después de mantenerse en reposo de nuevo durante 30 minutos, se añadió gota a gota trietilamina (0,071 ml, 0,511 mmol). Después de agitar 30 min a -78 °C, se retire el baño frío y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo tres veces con DCM. Los extractos se lavaron tres veces con NH<sub>4</sub>Cl, una vez con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo en bruto se disolvió en DCM (3 ml) y se añadieron pirrolidina (0,017 ml, 0,201 mmol) y *tetraquis* trifenilfosfina paladio (2,90 mg, 2,51 µmol). La mezcla se mantuvo en reposo durante 1 hora, se lavó con NH<sub>4</sub>Cl y después salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta un residuo. El residuo se purificó por HPLC prep. (sunfire ACN/agua TFA al 0,1 %) con una solución de NaHCO<sub>3</sub> sódica colocada en los tubos antes de ejecutarse para neutralizer inmediatamente las muestras. El pico principal se recogió para proporcionar el producto esperado evaporando el disolvente en exceso y después, extrayéndolo con DCM. El producto se volvió a purificar mediante gradiente de etapa al 3-6 % de biotage DCM/MeOH (1 % incremento cada vez). El pico principal se recogió, se sometió a azeotropía muchas veces con cloroformo para retirar metanol y proporcionó el dímero THIQ-AZI (**IIc-01**) (7 mg, 8,34 µmol, rendimiento del 16,60 %). CLEM (M+H) = 672,15.

#### Ejemplo 19 – Dímero-enlazador (**IIla-03**)

A una solución del compuesto **96** (Senter *et al.* 2010; 10 mg, 0,014 mmol) y el dímero **IIa-16** (13,01 mg, 0,019 mmol) en DMSO (0,5 ml) se le añadió base de Hunig (7,10 µl, 0,041 mmol) y se agitó a TA durante una noche. Esta se purificó en Shimadzu R-HPLC usando XBridge prep C18, columna de 5 µm y acetonitrilo al 5-55 %/agua (ácido fórmico al 0,05 %) durante 30 min.



Una fracción recogida a los 24 min proporcionó el dímero-enlazador **IIla-03** (5,6 mg, 4,36 µmol, rendimiento del 32,2 %). Las fracciones con la masa correcta se filtraron a través de una resina básica (PL-HCO<sub>3</sub> MP -Resina 1,8 mmol/g; Agilent Part n.º PL3540-n.º 603) y se lavó con acetonitrilo (5 ml) antes de la liofilización. EM (m+1) = 1284.

#### Ejemplo 20 – Dímero **IIa-20** y dímero-enlazador **IIla-04**

Este ejemplo y las **Figs. 18a y 18b** se refieren a la síntesis del dímero (**IIa-20**) y del dímero-enlazador (**IIla-04**).

A una solución de trifenilfosfina (1,385 g, 5,28 mmol), compuesto **20** (2 g, 4,40 mmol) y compuesto **51** (1,165 g, 6,16 mmol) en THF (10 ml) se le añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 1,026 ml, 5,28 mmol) a 0 °C. Después de agitar a TA durante una noche. La concentración y la purificación en una columna ISCO



COMBIFLASH™ de 120 g usando un eluyente EtOAc al 0-100 %/hexano proporcionó el alcohol **108** (1,28 g, 2,045 mmol, rendimiento del 46,5 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+Na) = 648,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,48 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 7,22 (m, 1H), 5,93 (m, 1H), 5,50 (t, J = 10,0 Hz, 1H), 5,31 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,22 (dd, J = 10,8, 1,6 Hz, 1H), 5,17 (d, J = 15,2 Hz, 1H), 4,70 (t, J = 1,2 Hz, 1H), 4,63 (m, 2H), 4,43 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,79 (m, 4H), 3,57 (m, 4H), 3,01 (dd, J = 15,2, 2,0 Hz, 1H), 2,07 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 0,997 (m, 2H), 0,06 (s, 9H).

Una suspensión del alcohol **108** (0,64 g, 1,023 mmol) y trietilamina (TEA, 0,214 ml, 1,534 mmol) en DCM (10 ml) se enfrió a 0 °C y se trató con cloruro de metanosulfonilo (MsCl, 0,104 ml, 1,330 mmol). Después de agitar durante 60 min a 0 °C, la CLEM mostró la conversión al 50 % al producto. Se añadieron más TEA (0,214 ml, 1,534 mmol) y MsCl (0,104 ml, 1,330 mmol) y la agitación se continuó durante 1 h para conseguir la conversión completa. La reacción se interrumpió con agua enfriada con hielo (30 ml), se extrajo con DCM (2x30 ml), y se lavó con agua enfriada con hielo (30 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró en un evaporador rotatorio hasta mesilato **109** (0,713 g, 1,012 mmol, rendimiento del 99 %). EM (m+1) = 704,2.

A una solución del compuesto **106** (336 mg, 0,852 mmol) y el mesilato **109** (500 mg, 0,710 mmol) en DMSO (2 ml) se le añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (196 mg, 1,421 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml) y agua (50 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2x50 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron en una columna ISCO COMBIFLASH™ de 80 g usando un gradiente de elución de EtOAc al 0-100 %/hexano durante 45 min proporcionando el compuesto **110** (180 mg, 0,180 mmol, rendimiento del 25,3 %). EM (m+1) = 1003,3.

A una solución del compuesto **110** (180 mg, 0,180 mmol) en THF (4 ml) se le añadió trietilborohidruro de litio (SUPER HYDRIDE™, 0,898 ml, 0,898 mmol) a -76 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La reacción se interrumpió con agua fría (1 ml) y se extrajo con DCM (3x10 ml). La capa orgánica se concentró y se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1 = 4 ml) y gel de sílice (1 g) durante 2 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 50 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de 40 g gel de sílice usando un eluyente MeOH/DCM durante 15 min. La fracción de MeOH al 10 %/DCM a los 9 min proporcionó el compuesto **111** (151 mg, 0,143 mmol, rendimiento del 80 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 856,3.

A una solución del compuesto **111** (151 mg, 0,176 mmol) en DCM (3 ml) se le añadieron Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (10,19 mg, 8,82 μmol) y pirrolidina (0,058 ml, 0,706 mmol). La mezcla de reacción se agitó en nitrógeno a TA. La concentración y la purificación en una columna ISCO de 24 g de gel de sílice usando MeOH al 0-20 %/DCM proporcionó el dímero (**Ila-20**) (42 mg, 0,058 mmol, rendimiento del 32,9 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 688,2. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,55 (s, 1H), 7,48 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,25-7,40 (m, 9H), 7,21 (m, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 5,03 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,83 (c, J = 15,6 Hz, 2H), 4,57 (d, J = 15,2, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,21 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,13 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,51 (s, 1H), 3,46 (dd, J = 10,8, 2,0 Hz, 1H), 3,20-3,30 (m, 6H), 3,12 (dd, J = 15,2, 6,0 Hz, 2H), 2,83 (dd, J = 15,2, 5,6 Hz, 2H).

A una solución de carbonato de *p*-nitrofenilo **96** (20 mg, 0,027 mmol) y el dímero (**Ila-20**) (22,37 mg, 0,033 mmol) en DMSO (1 ml) se le añadió DIPEA (0,014 ml, 0,081 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche. El producto de reacción se purificó por R-HPLC usando un XBridge prep OBD C18, columna de 5 μm (30x250 mm) y acetonitrilo al 5-55 %/agua (ácido fórmico al 0,05 %) durante 40 min (4 inyecciones). Una fracción recogida a los 31,8 min se filtró a través de una resina básica (PL-HCO<sub>3</sub> MP -Resina 1,8 mmol/g; Agilent Part n.º PL3540-n.º 603) y se lavó con acetonitrilo (5 ml). La liofilización proporcionó el dímero-enlazador (**Illa-04**) (8 mg, 5,91 μmol, rendimiento del 21,79 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1286,5.

### Ejemplo 21 – Dímero **Ila-21**

Este ejemplo y la Fig. 19 se refiere a la síntesis del dímero (**Ila-21**).

Una suspensión de fenol **72** (68 mg, 0,13 mmol), 1,3-bis(bromometil)benceno **97** (17 mg, 0,065 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (42 mg, 0,13 mmol) en acetona (0,4 ml) se calentó a 40 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 30-80 % en hexanos para proporcionar dos compuestos. El primero en eluir fue el compuesto monoalquilado **99** (15,6 mg, rendimiento del 17 %). CLEM M+H = 707,10. El segundo en eluir fue el dímero **98** (13,5 mg, rendimiento del 18 %). CLEM M+H = 1151,20.

Se disolvió el dímero **98** (13,5 mg, 0,012 mmol) en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,7 ml, 0,029 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (2,2 mg, 1,9 μmol). La mezcla se agitó durante 30 min y se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado. Las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Los orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta obtener un residuo, que después se purificó por HPLC preparativa (columna OBD preparativa Sunfire C18 19x100 mm; Disolvente A = 95 % de agua, 5 % de Acetonitrilo + TFA al 0,1 %; Disolvente B = 5 % de agua, 95 % de Acetonitrilo + TFA al 0,1 %; gradiente del

0-100 % durante 10 min). La muestra se dividió en dos inyecciones iguales. Las fracciones que contenían el pico de producto se combinaron y se hicieron pasar a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>-MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotativa y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero **Ila-21** en forma de un polvo de color blanco (5,18 mg, rendimiento del 58 %). CLEM M+H = 719,10. HRMS encontrado: M+H = 719,2851, calculado: 719,2864.

#### Ejemplo 22 – Dímero Ila-22

Este ejemplo y la Fig. 20 se refiere a la preparación del dímero (**Ila-22**).

Una suspensión del diol **100** (0,25 g, 1,40 mmol, prepared per *J. Med. Chem.* 2011, 4350) y NEt<sub>3</sub> (0,58 ml, 4,19 mmol) en DCM (5 ml) se enfrió en un baño de hielo-agua y se trató con MsCl (0,25 ml, 3,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 2 h, después se inactivó mediante la adición de agua. Las capas de la mezcla bifásica se separaron y la fase acuosa se extrajo de nuevo con una porción de DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl diluido frío (0,05 N) seguido de salmuera, y después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La evaporación del disolvente proporcionó el mesilato **101** en forma de un sólido de color blanco, que se usó sin purificación adicional (0,425 g, rendimiento del 91 %) RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CLOROFORMO-d) δ 7,25 (s, 1H), 7,11 (s, 2H), 5,29 - 5,18 (m, 4H), 3,05 (s, 6H).

Una suspensión del fenol **72** (94 mg, 0,18 mmol), mesilato **101** (30 mg, 0,089 mmol) y CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (73 mg, 0,22 mmol) en acetona (0,4 ml) se calentó a 40 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 30-80 % en hexanos para proporcionar el dímero **102** (82,6 mg, rendimiento del 77 %). CLEM M+H=1192,15.

El dímero **102** (41,3 mg, 0,035 mmol) se desprotegió de acuerdo con el método para el dímero (**Ila-21**) para proporcionar el dímero (**Ila-22**) en forma de un polvo de color blanco (7,08 mg, rendimiento del 26 %). CLEM M+H=760,10. HRMS encontrado: M+H=760,2872, calc.: 760,2878.

#### Ejemplo 23 – Dímero-enlazadores IIlb-07 y IIlb-08

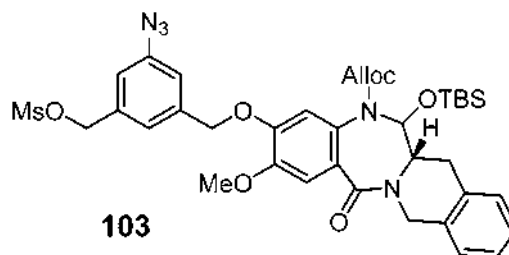
Este ejemplo y la Fig. 21 se refieren a la preparación de los dímero enlazadores (**IIlb-07**) y (**IIlb-08**).

El compuesto **104a** se preparó a partir del fenol **80** y el compuesto monoalquilado **99** como sigue a continuación. El fenol **80** (18,6 mg, 0,022 mmol), compuesto **99** (15,6 mg, 0,022 mmol) y CS<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,18 mg, 0,022 mmol) se suspendieron en acetona (0,11 ml) y se calentaron hasta 40 °C durante 1,5 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con ácido cítrico 0,1 M. Las fases orgánicas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El material en bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc al 30-100 % en hexanos para proporcionar el producto **104a** (23,3 mg, rendimiento del 72 %). CLEM M+H=1472,20.

El dímero **104a** (23,3 mg, 0,016 mmol) se disolvió en THF (0,4 ml) y se añadió una solución de TBAF en THF (0,035 ml, 1,0 M, 0,035 mmol). La mezcla se agitó durante 0,5 h, y se repartió entre EtOAc y NH<sub>4</sub>Cl saturado, las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta un residuo, que después, se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM para proporcionar el compuesto **105a** (16,4 mg, rendimiento del 83 %). CLEM M+Na=1265,25.

El dímero **105a** (16,4 mg, 0,013 mmol) se disolvió en una solución de pirrolidina en DCM (0,042 M, 0,8 ml, 0,033 mmol) y se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,2 mg, 1,04 µmol). La mezcla se agitó durante 1 h, se repartió entre DCM y NH<sub>4</sub>Cl saturado, las fases se separaron y la fracción acuosa se extrajo dos veces más con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron hasta un residuo para obtener la amina **106a**, que se usó sin purificación adicional (rendimiento cuantitativo asumido).

La amina **106a** (13,7 mg, 0,13 mmol) se disolvió en una solución de DIPEA en DMF (0,05 M, 0,31 ml, 0,016 mmol) y se añadió el compuesto **84** (8 mg, 0,026 mmol). La mezcla se agitó durante 20 horas, momento en el cual se diluyó con DMF y se purificó por HPLC preparativa (columna Sunfire C18 prep OBD 19x100 mm, Disolvente A = agua al 95 %, acetonitrilo al 5 % +TFA al 0,1 %; Disolvente B = agua al 5 %, acetonitrilo al 95 % +TFA al 0,1 %. Gradiente de 0-100 % durante 10 min. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se pasaron a través de un cartucho PL-HCO<sub>3</sub>- MP SPE 500 mg/6 ml, eluyendo con acetonitrilo para proporcionar una solución del producto como una base libre. La mayor parte del disolvente orgánico se retiró por evaporación rotatoria y el agua se retiró por liofilización para proporcionar el dímero-enlazador (**IIlb-07**) en forma de un polvo de color blanco (7,10 mg, rendimiento del 42 %). CLEM M+H=1249,35. HRMS encontrado: M+H = 1249,5221, calc.: 1249,5241.



El bis-mesilato **101** (100 mg, 0,191 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto **72**, de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **99**, para proporcionar el monomesilato **103** (74,6 mg, rendimiento del 51 %). CLEM M+H=764,10.

El mono-mesilato **103** (46,8 mg, 0,061 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto **80**, de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **104a**, para proporcionar el compuesto **104b** (68,8 mg, rendimiento del 74 %). CLEM M+H=1511,95.

El compuesto **104b** (68,8 mg, 0,046 mmol) se desprotegió de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **105a**, para proporcionar el compuesto **105b** (51,4 mg, rendimiento del 88 %).

El compuesto **105b** (51,4 mg, 0,040 mmol) se desprotegió de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **106a**, para proporcionar la amina **106b** (44 mg, rendimiento del 100 %, usada en bruto en la siguiente etapa).

La amina **106b** (46,8 mg, 0,061 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto **84** de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del dímero-enlazador (**IIIb-07**) para proporcionar el dímero-enlazador (**IIIb-08**) (13,5 mg, rendimiento del 25 %). HRMS encontrado: M+H= 1290,5245, calc.: 1290,5255.

#### **Ejemplo 24 – Dímero-enlazador IIIb-04**

Este ejemplo y la **Fig. 22** se refieren a la síntesis del dímero-enlazador (**IIIb-09**).

Se hizo reaccionar bis-yodoetil éter (46 mg, 0,088 mmol) con el compuesto **72**, de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **99**, para proporcionar el compuesto **107** (29 mg, rendimiento del 46 %). CLEM M+H=723,20.

Se disolvió silil éter **78** (431 mg, 0,486 mmol) en DMF (2,0 ml) y agua (0,04 ml) y se trató con acetato de litio (32 mg, 0,486 mmol). La mezcla se calentó a 40 °C durante 2,5 h y se agitó a TA una hora adicional, después el disolvente se retiró en una corriente de nitrógeno durante 3 días. El residuo se trató con ácido cítrico 0,1 M y se extrajo tres veces con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron. La mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice, eluyendo con un gradiente de MeOH al 0-10 % en DCM para proporcionar fenol **108** (297 mg, rendimiento del 84 %). CLEM M+H = 730,40.

El compuesto mono-yodo **107** (29 mg, 0,04 mmol) se hizo reaccionar con el fenol **108** de una manera análoga a la que se describe para la síntesis del compuesto **104s**, para proporcionar el compuesto **109** (18,8 mg, rendimiento del 35 %). CLEM M + Na = 1347,15.

El compuesto **109** (18,8 mg, 0,014 mmol) se desprotegió de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del compuesto **106a**, para proporcionar la amina **110** (13 mg, rendimiento del 100 %, usada en bruto en la siguiente etapa).

La amina **110** (14 mg, 0,014 mmol) se hizo reaccionar con el compuesto **84** de una manera análoga a la que se ha descrito para la síntesis del dímero-enlazador (**IIIb-07**), para proporcionar el dímero-enlazador (**IIIb-09**) (8,6 mg, rendimiento del 53 %). CLEM M+Na=1239,75.

#### **Ejemplo 25 – Dímero-enlazadores IIIa-05, -06, -07 y -08**

Este ejemplo y la **Fig. 23** se refieren a la preparación de dímero-enlazadores **IIIa-05**, **IIIa-06**, **IIIa-07** y **IIIa-08**. Estos dímero-enlazadores tienen un grupo alquilamino en el componente enlazador y pueden servir como donantes de aminas en una conjugación mediada por transglutaminasa para hacer un ADC.

A una solución del compuesto **54** (850 mg, 0,869 mmol) y el compuesto **111** (n.º de reg. CAS 863971-53-3, 666 mg, 0,869 mmol) en NMP (7 ml) se le añadió DIPEA (0,228 ml, 1,303 mmol). La solución se agitó a TA durante una noche. La CLEM mostró la formación del producto. La reacción en bruto se sometió directamente a cromatografía

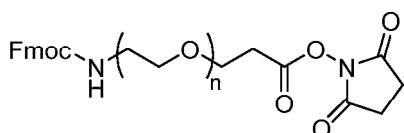
COMBIFLASH™ sobre una columna de 120 g de gel de sílice, eluyendo con MeOH/DCM durante 45 min. Las fracciones a los 18 min proporcionaron el compuesto **112** (0,8 g, rendimiento del 57 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1605,6.

5 A una solución del compuesto **112** (0,7 g, 0,436 mmol) en THF (5 ml) se le añadió piperidina (0,5 ml, 5,05 mmol). La solución se agitó a TA durante 30 min. La CLEM mostró que la reacción se había completado. La concentración y la purificación sobre una columna de 80 g COMBIFLASH™ de gel de sílice usando MeOH/DCM durante 40 min, proporcionó una fracción de MeOH al 30 %/DCM a los 19-23 min, que produjo el compuesto **113** (0,475 g, 0,343 mmol, rendimiento del 79 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1383,6. RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10,11 (s, 2H), 8,13 (s, 2H), 7,57 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,23 (m, 14 H), 5,96 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 5,76 (s, 1H), 5,39 (s, 4H), 5,26 (t, J = 6,0 Hz, 4H), 5,08 (dd, J = 22,0, 10,4 Hz, 4H), 5,01 (s, 2H), 4,92 (d, J = 15,6 Hz, 4H), 4,47 (m, 2H), 4,31 (m, 5H), 4,21 (m, 5H), 4,10 (c, J = 5,2 Hz, 2H), 3,76 (m, 10 H), 3,18 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 3,03 (m, 6H), 2,68 (m, 2H), 2,34 (m, 2H), 1,93 (m, 3H), 1,50-1,70 (m, 6H), 1,39 (m, 5H), 0,88 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,78 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,74 (m, 9H), 0,09, 0,10 (m, 9H).

15 A una solución del compuesto **113** (975 mg, 0,705 mmol) en THF (10 ml) a -76 °C se le añadió LiEt<sub>3</sub>BH (SUPERHYDRIDE™, 3,52 ml, 3,52 mmol). La solución se agitó durante 1 h. La CLEM mostró que la reacción se había completado. La reacción se interrumpió con agua fría (1 ml) y se concentró. El residuo resultante se trató con DCM/EtOH/agua (1:2:1 = 8 ml) y gel de sílice (1 g) durante 3 días. Esta mezcla se filtró a través de un embudo sinterizado y el gel de sílice se lavó con DCM-MeOH (8:2, 100 ml). El filtrado se concentró a alto vacío y se purificó en una columna de 24 g de gel de sílice usando MeOH/DCM durante 15 min. La fracción de MeOH al 20 %/DCM proporcionó el compuesto **114** (422 mg, 0,387 mmol, rendimiento del 54,9 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1091,6.

25 A una solución del compuesto **114** (67 mg, 0,061 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida éster **115** (30,4 mg, 0,068 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió 2,6-lutidina (0,014 ml, 0,123 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. La CLEM mostró la conversión casi completa al producto **116**. Se añadió piperidina (0,1 ml, 1,010 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se inyectó en una columna ISCO 150 g C18 y eluyendo con agua/acetonitrilo (ácido fórmico al 0,05 %) durante 30 min. La fracción de agua al 34 %/acetonitrilo a los 27 min se filtró a través de una resina básica (PL-HCO<sub>3</sub> MP -Resina 1,8 mmol/g; Agilent Part n.º PL3540-n.º 603) y se lavó con acetonitrilo (5 ml). La liofilización proporcionó el dímero-enlazador **IIla-08** (27,5 mg, 0,020 mmol, rendimiento del 33,1 %) en forma de un sólido de color blanco. EM (m+1) = 1204,6.

35 Los dímero-enlazadores **IIla-05** (EM (m+1) = 1338,5), **IIla-06** (EM (m+1) = 1514,06) y **IIla-07** (EM (m+1) = 1250,2) se prepararon de manera análoga a partir del compuesto **114**, usando los *N*-hidroxisuccinimida ésteres correspondientes.



n.º de reg. CAS 1807534-85-5, n = 2

n.º de reg. CAS 1314378-14-7, n = 4

n.º de reg. CAS 1334170-03-4, n = 8

#### 40 Ejemplo 26 - Actividad biológica de los dímeros

La actividad citotóxica de los dímeros de la presente invención se sometió a ensayo frente a estirpes celulares de cáncer de pulmón H226, cáncer renal 786-O, cáncer gástrico N87, cáncer renal 786-O y/o cáncer de ovario OVCAR3. La capacidad de los dímeros para inhibir la proliferación celular puede medirse mediante un ensayo de luminiscencia ATP o un ensayo de proliferación celular MTS. Generalmente, estos dos métodos producen resultados comparables.

Este es un procedimiento general para un ensayo de luminiscencia ATP: Se siembran células a 1 x 10<sup>3</sup> células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 h para ensayos ATP CellTiterGlo™, respectivamente. Se añaden diluciones en serie (1:3) de compuestos a los pocillos. Las placas se dejan incubar durante 72 h. Se usa un kit de viabilidad celular CellTiterGlo™ de Promega para medir el contenido de ATP de las células tratadas con compuestos de ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. Una disminución en el contenido de ATP es una medida de disminución en la viabilidad celular. El valor de CE<sub>50</sub>, la concentración a la que un agente reduce la viabilidad celular en un 50 % del efecto máximo, puede calcularse usando el software PRISM™, versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

El ensayo de proliferación celular MTS se realizó de la siguiente manera: Se usa el kit de proliferación celular acuoso no radiactivo CellTiter 96 de Promega (Madison, WI) para determinar el número de células viables en el ensayo de proliferación celular. Las células tumorales se siembran en placas a determinadas densidades de siembra en placas Matrix de fondo transparente de color negro estériles de 384 pocillos a 40 µl por pocillo y se incuban durante la noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % antes del ensayo. Al día siguiente, se usa un conjunto de placas celulares (10 placas)

para determinar la densidad celular a tiempo cero y se añade 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio a 4 µl/pocillo en 10 placas seguido de incubación a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres horas. Este reactivo de tetrazolio es biorreducido por las células hepáticas para formar un producto de formazán que es soluble en solución acuosa. La absorbancia a 490 nm se mide en un lector Envision (Perkin Elmer, Boston, MA). El mismo día, se añaden los compuestos a las placas celulares restantes (placas T72) y se incuban a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 72 horas, se añaden 4 µl de reactivos MTS en esas placas celulares. Las placas se incuban adicionalmente a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante tres horas y los valores de absorbancia a A490 se midieron en un lector Envision.

10 Los resultados se presentan en la Tabla IA:

| Tabla IA: Actividad biológica de los dímeros |  |        |        |
|--|--|--------|--------|
| Dímero                                       | Estirpe celular de cáncer: CE <sub>50</sub> (pM) |        |        |
|  | H226   | N87    | OVCAR3 |
| Da-01  | —  | 16     | 150    |
| Da-02  | 46-180   | 49-150 | 77-120 |
| Da-03  | 410  | 460    | 180    |
| Da-04  | 8000   | 5700   | 2600   |
| Da-05  | 150  | 150    | 90     |
| Ila-10                                       | 20   | 30     | 20     |
| Ila-16                                       | 188  | —      | —      |
| Ila-18                                       | 3200   | —      | —      |
| Da-20  | —  | 1,3    | —      |
| Da-21  | —  | 0,02   | —      |
| Da-22  | —  | 0,05   | —      |
| Ilb-01                                       | 440  | 330    | 220    |
| Ilb-03                                       | 150  | 110    | 330    |
| Ilc-01                                       | —  | 0,28   | —      |

En la Tabla IB se presentan resultados adicionales, pruebas contra líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas DMS 79 y H187

15

| Tabla IB: Actividad biológica de los dímeros |  |                  |
|--|--|------------------|
| Dímero                                       | Estirpe celular de cáncer: CI <sub>50</sub> (nM) |                  |
|  | DMS 79   | H <sub>187</sub> |
| Ilb-03                                       | 0,003  | 0,002            |
| Ila-16                                       | 0,006  | 0,005            |

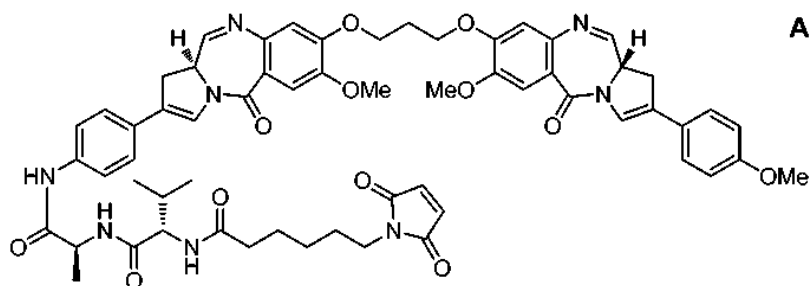
#### **Ejemplo 27 - Actividad biológica de conjugados**

Los compuestos enlazadores de dímero se conjugaron con varios anticuerpos, siguiendo el procedimiento general descrito anteriormente: anticuerpo 4A6 (anticuerpo anti-glipicano 3; Terrett et al. US 8,680,247 B2 (2014)); anticuerpo 1F4 (anticuerpo anti-CD70; Coccia et al. US 2010/0150950 A1 (2010)); y anticuerpo 6A4 (anticuerpo anti-mesotelina; Terrett et al. US 8,268,970 B2 (2012)). Las secuencias de CDR y otras secuencias e información estructural de estos anticuerpos se describen en las referencias mencionadas anteriormente y dicha información se incorpora en el presente documento como referencia.

25

Se realizaron pruebas contra células de cáncer gástrico N87 y células de cáncer de hígado Hep 3B. La actividad se midió usando un ensayo de timidina <sup>3</sup>H (Cong et al. 2014). Las células N87 expresan mesotelina pero no CD70 o glypican-3. Las células Hep 3B expresan glypican-3 pero no mesotelina.

30 Los resultados se proporcionan en la Tabla IIA y IIB. También se proporcionan datos comparativos para los conjugados de un dímero-enlazador de PBD-PBD, compuesto A:



| Tabla IIA: Actividad biológica de los conjugados |                       |                  |          |                                |       |
|--|-----------------------|------------------|----------|--------------------------------|-------|
| Ref.   | Conjugado             |                  |          | Estirpe celular $CI_{50}$ (pM) |       |
|  | Anticuerpo (antígeno) | Dímero-enlazador | DAR      | N87                            | Hep3B |
| 1  | 6A4 (mesotelina)      | IIIa-01          | 0,9-1,6  | 3-11                           |       |
| 2  | 6A4 (mesotelina)      | IIIb-01          | 1,9-2,6  | 46-57                          | 1,400 |
| 3  | 6A4 (mesotelina)      | IIIb-03          | 1        | 1,300                          | —     |
| 4  | 6A4 (mesotelina)      | IIIc-01          | 1,1-1,2  | 2-9                            | —     |
| 5  | 6A4 (mesotelina)      | IIIc-08          | 2,9      | 130                            | —     |
| 6  | 6A4 (mesotelina)      | A                | 1        | 30                             | —     |
| 7  | 4A6 (glipican 3)      | IIIb-01          | 2,7      | 14,000                         | 28    |
| 8  | 1F4 (CD70)            | IIIa-01          | 0,6-1,5  | 2,900-3,400                    | —     |
| 9  | 1F4 (CD70)            | IIIb-01          | 2        | 5,600                          | —     |
| 10   | 1F4 (CD70)            | IIIb-03          | 1        | 6,700                          | —     |
| 11   | 1F4 (CD70)            | IIIc-01          | 0,83-1,1 | 1,200                          | —     |
| 12   | 1F4 (CD70)            | IIIc-08          | 2,3      | 1,200                          | —     |
| 13   | 1F4 (CD70)            | A                | 1,1      | 2,300                          | —     |

| Tabla IIB: Actividad biológica de los conjugados |                       |                  |     |                                |       |
|--|-----------------------|------------------|-----|--------------------------------|-------|
| Ref.   | Conjugado             |                  |     | Estirpe celular $CI_{50}$ (nM) |       |
|  | Anticuerpo (antígeno) | Dímero-enlazador | DAR | N87                            | 786-0 |
| 14   | Anti-mesotelina       | IIIa-01          | —   | 0,01                           | —     |
| 15   | Ant-CD70              | IIIa-01          | —   | —                              | 0,02  |
| 16   | Anti-mesotelina       | IIIa-03          | —   | 0,07                           | —     |
| 17   | Anti-mesotelina       | IIIb-01          | —   | 0,06                           | —     |
| 18   | Anti-CD70             | IIIb-01          | —   | —                              | 0,05  |
| 19   | Anti-mesotelina       | IIIb-02          | —   | 0,1                            | —     |
| 20   | Anti-mesotelina       | IIIb-03          | —   | 1,23                           | —     |
| 21   | Anti-CD70             | IIIb-03          | —   | —                              | 0,06  |
| 22   | Anti-mesotelina       | IIIc-01          | —   | 0,01                           | —     |
| 23   | Anti-CD70             | IIIc-01          | —   | —                              | 0,01  |
| 24   | Anti-mesotelina       | IIIc-08          | —   | 0,13                           | —     |
| 25   | Anti-CD70             | IIIc-08          | —   | —                              | 0,02  |

- 5 En la Tabla IIC se presentan resultados adicionales, pruebas contra líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas DMS 79 y H187, que expresan el antígeno fucosil GM1.

| Tabla IIC: Actividad biológica de los conjugados |                  |                  |     |                                 |         |
|--|------------------|------------------|-----|---------------------------------|---------|
| Ref.   | Conjugado        |                  |     | Estirpe celular: $CI_{50}$ (nM) |         |
|  | Anticuerpo       | Dímero-enlazador | DAR | DMA 79                          | H187    |
| 26   | Anti-fucosil GM1 | IIIa-03          | ~2  | 0,6-1,7                         | 0,5-1,0 |

- 10 Sin embargo, en la Tabla IID se presentan resultados adicionales, contra N87, H226, 786-0 líneas celulares de cáncer. Los anticuerpos que tienen una sustitución N297A se conjugaron usando transglutaminasa, como se discutió anteriormente. La mutación N297A hace que Q295 sea accesible como un aceptor de amina para la transglutaminasa para hacer conjugados con un DAR teórico de 2, aunque en la práctica se obtienen conjugados con DAR en el intervalo de de 1,5 a 2.

N87 es una estirpe celular de cáncer de estómago (gástrico) que expresa mesotelina pero no CD70 o fucosil GM1. H226 es una estirpe celular de cáncer de pulmón que expresa mesotelina pero no CD70 o fucosil GM1. 786-0 es una estirpe celular de cáncer renal que expresa CD70 pero no mesotelina o fucosil GM1.

5

| Tabla IID: Actividad biológica de los conjugados |                   |                  |     |                           |                       |
|--|-------------------|------------------|-----|---------------------------|-----------------------|
| Ref.   | Conjugado         |                  |     | Estirpe celular de cáncer | CE <sub>50</sub> (nM) |
|  | Anticuerpo        | Dímero-enlazador | DAR |                           |                       |
| 27   | Anti-mesotelina*  | IIIa-05          | —   | N87                       | 0,037                 |
| 28   | Anti-fucosil GM1* | IIIa-05          | —   | N87                       | 16,27                 |
| 29   | Anti-mesotelina*  | IIIa-06          | —   | N87                       | 0,028                 |
| 30   | Anti-fucosil GM1* | IIIa-06          | —   | N87                       | 6,9                   |
| 31   | Anti-mesotelina   | IIIa-03          | 3   | N87                       | 0,026                 |
| 32   | Anti-CD70         | IIIa-03          | 2.8 | N87                       | 3,4                   |
| 33   | Anti-fucosil GM1* | IIIa-05          | —   | H <sub>226</sub>          | 7,4                   |
| 34   | Anti-mesotelina*  | IIIa-06          | —   | H <sub>226</sub>          | 0,011                 |
| 35   | Anti-fucosil GM1* | IIIa-06          | —   | H <sub>226</sub>          | 4,0                   |
| 36   | Anti-mesotelina * | IIIa-05          | —   | H <sub>226</sub>          | 0,012                 |
| 37   | Anti-mesotelina   | IIIa-03          | 3   | H <sub>226</sub>          | 0,0070                |
| 38   | Anti-CD70         | IIIa-03          | 2.8 | H <sub>226</sub>          | 0,54                  |
| 39   | Anti-mesotelina   | IIIa-08          | 3   | 786-0                     | 60                    |
| 40   | Anti-CD70         | IIIa-03          | 2.8 | 786-0                     | 0,19                  |
| 41   | Anti-mesotelina*  | IIIa-06          | —   | 786-0                     | 45                    |
| 42   | Anti-fucosil GM1* | IIIa-06          | —   | 786-0                     | 44                    |
| * Anticuerpo tiene sustitución N297A.            |                   |                  |     |                           |                       |

En una realización, en conjugados de esta invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-mesotelina, anti-CD70, anti-glicopirano 3 o anti-fucosil GM1.

- 10 La descripción detallada anterior de la invención incluye pasajes que se refieren principalmente o exclusivamente a partes o aspectos particulares de la invención. Ha de comprenderse que esto es por claridad y conveniencia, que una característica particular puede ser pertinente en más pasajes que en el que se describe y que la divulgación del presente documento incluye todas las combinaciones apropiadas de información encontradas en los diferentes pasajes. De manera similar, aunque las diversas figuras y descripciones en el presente documento se refieren a realizaciones específicas de la invención, ha de comprenderse que cuando se desvela una característica específica en el contexto de una figura o realización particular, dicha característica también puede usarse, en la medida adecuada, en el contexto de otra figura o realización, en combinación con otra característica, o en la invención en general.
- 15
- 20 Adicionalmente, aunque la presente invención se ha descrito en particular en términos de determinadas realizaciones preferidas, la invención no se limita a dichas realizaciones preferidas. Más bien, el alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

## Referencias

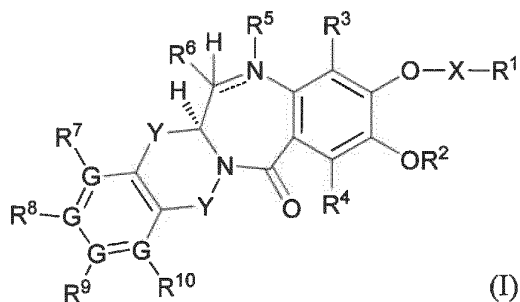
- 25 A continuación se proporcionan citas completas de las siguientes referencias citadas de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anteriormente en la presente memoria descriptiva.
- 30 Antonow et al., *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2927.  
 Beau-Larvor et al., documento WO 2014/174111 A1 (2014).  
 Bose et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114 (12), 4939.  
 Bouchard et al., documento US 8.404.678 B2 (2013).  
 Chari et al., documento WO 2013/177481 A1 (2013).  
 Commercon et al., documento US 8.481.042 B2 (2013) [2013a].  
 35 Commercon et al., documento US 2013/0137659 A1 (2013) [2013b].  
 Fishkin et al., documento WO 2012/112687 A1 (2012).  
 Fishkin et al., documento US 8.765.740 B2 (2014).  
 Flygare et al., documento US 2013/0266595 A1 (2013).  
 Gauzy et al., documento US 8.163.736 B2 (2012).  
 40 Gregson et al., *Chem. Comm.* 1999 (9), 797.  
 Gregson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 2859 [2001a].  
 Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 737 [2001b].

- Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1161.  
 Gregson et al., documento US 7.612.062 B2 (2009).  
 Hartley, *Exp. Opin. Investigational Drugs* 2011, 20 (6), 733.  
 Hartley et al., *Investigational New Drugs* 2012, 30, 950.
- 5 Howard, documento US 2014/0120118 A1 (2014) [2014a].  
 Howard, documento US 2014/0127239 A1 (2014) [2014b].  
 Howard, documento WO 2014/096365 A1 (2014) [2014c].  
 Howard, documento WO 2014/096368 A1 (2014) [2014d].  
 Howard, documento WO 2014/140174 A1 (2014) [2014e].
- 10 Howard et al., documento US 2007/0191349 A1 (2007).  
 Howard et al., documento US 7.528.126 B2 (2009) [2009a].  
 Howard et al., documento US 7.557.099 B2 (2009) [2009b].  
 Howard et al., documento US 7.741.319 B2 (2010).  
 Howard et al., documento US 2011/0256157 A1 (2011).
- 15 Howard et al., documento US 8.501.934 B2 (2013) [2013a].  
 Howard et al., documento US 8.592.576 B2 (2013) [2013b].  
 Howard et al., documento US 2013/0028919 A1 (2013) [2013c].  
 Howard et al., documento WO 2013/041606 A1 (2013) [2013e].  
 Howard et al., documento US 8.697.688 B2 (2014) [2014a].
- 20 Howard et al., documento US 2014/0120118 A1 (2014).  
 Howard et al., documento US 2014/0234346 A1 (2014) [2014b].  
 Howard et al., documento US 2014/0274907 A1 (2014) [2014c].  
 Howard et al., documento US 2014/0294868 A1 (2014).  
 Howard et al., documento WO 2014/096368 A1 (2014).
- 25 Howard et al., documento WO 2014/140174 A1 (2014).  
 Howard et al., documento WO 2014/140862 A2 (2014) [2014d].  
 Jeffrey et al., *Bioconj. Chem.* 2013, 24, 1256.  
 Jeffrey et al., documento US 2014/0286970 A1 (2014) [2014a].  
 Jeffrey et al., documento US 2014/0302066 A1 (2014) [2014b].
- 30 Kothakonda et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 4371.  
 Li et al., documento WO 2010/091150 A1 (2010).  
 Li et al., documento US 8.426.402 B2 (2013).  
 Li et al., documento WO 2014/031566 A1 (2014).  
 Liu et al., documento US 7.244.724 B2 (2007).
- 35 Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.  
 Senter et al., documento US 7.659.241 B2 (2010).  
 Thurston et al., *J. Org. Chem.* 1996, 61 (23), 8141.  
 Thurston et al., *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1951.  
 Thurston et al., documento US 7.049.311 B1 (2006).
- 40 Thurston et al., documento US 7.407.951 B1 (2008).  
 Zhao et al., documento WO 2014/080251 A1 (2014).



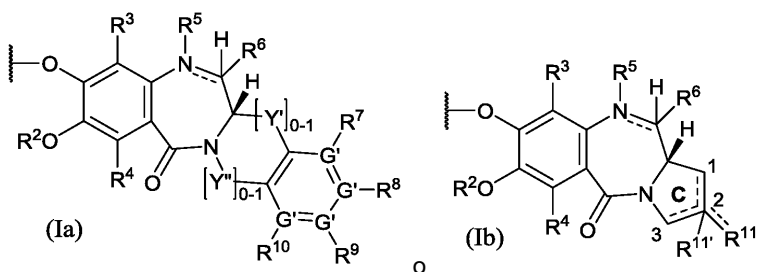
## REIVINDICACIONES

1. Un dímero de benzodiazepina que tiene una estructura representada por la fórmula (I)



en la que

$R^1$  es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):



cada G y G' es C o N, con la condición de que no más de dos G o dos G' sean N; cada  $R^2$  es independientemente H o alquilo  $C_1-C_5$ ;

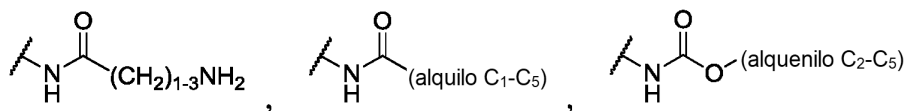
cada  $R^3$  y  $R^4$  es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo  $C_1-C_3$ , O(alquilo  $C_1-C_3$ ), ciano,  $(CH_2)_{0-5}NH_2$  o  $NO_2$ ;

cada línea doble  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

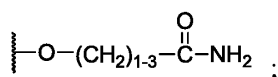
cada  $R^5$  es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada  $R^6$  es H, OH,  $SO_3Na$  o  $SO_3K$  si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_5$ ,  $C\equiv C(CH_2)_{1-5}X^2$ , OH, O(alquilo  $C_1-C_5$ ), ciano,  $NO_2$ , F, Cl, Br,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}$ (alquilo  $C_{1-3}$ ),  $(CH_2)_{0-5}X^2$ ,  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ ;



o

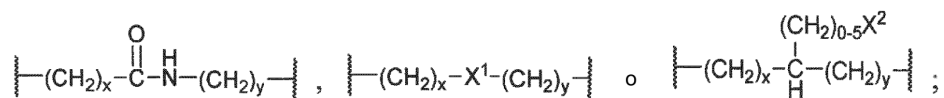


o donde un  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  están unidos a un G o G' que es N, tal como  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  o  $R^{10}$  está ausente;

las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2- $R^{11}$ ;  $R^{11}$  es H,  $=O$ ,  $=CH_2$ ,  $=CH$ (alquilo  $C_1-C_5$ ),  $CH=CH(CH_2)_{1-5}X^2$ ,  $C\equiv C(CH_2)_{1-5}X^2$ , alquilo  $C_1-C_5$ , OH, O(alquilo  $C_1-C_5$ ), ciano,  $NO_2$ , F, Cl, Br,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}$ (alquilo  $C_{1-3}$ ),  $(CH_2)_{0-5}X^2$ , arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$ ,  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ ;

$R^{11}$  está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2- $R^{11}$  y de lo contrario es H;

X es



$\text{X}^1$  es  $\text{CH}_2$ , O, NH,  $\text{S}(\text{O})_{0-2}$ , cicloalquileo o heterocicloalquileo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ , arileno de 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$  o heteroarileno de 5 miembros sin sustituir o sustituido con  $(\text{CH}_2)_{0-5}\text{X}^2$  o  $\text{O}(\text{CH}_2)_{2-5}\text{X}^2$ ;

cada  $\text{X}^2$  es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ), O(alquileo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{N}_3$ , CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{NH}_2$ , NH(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_5$ ), N(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_5$ )<sub>2</sub>, SH, CHO, N( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N(alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ),  $\text{NHNH}_2$  o  $\text{C}(\text{=O})\text{NHNH}_2$ ;

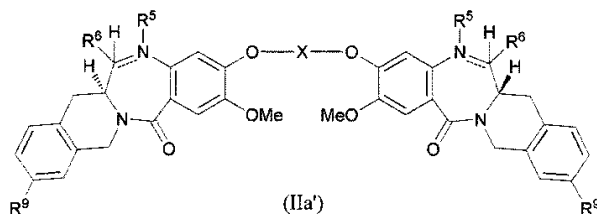
$x$  e  $y$  son independientemente 1, 2 o 3;

cada  $Y$  es independientemente  $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}=\text{O}$  o  $\text{CHR}^{12}$ ; en donde cada  $\text{R}^{12}$  es independientemente F, Cl, Br o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ;  $y$

$Y'$  e  $Y''$  son independientemente  $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}=\text{O}$  o  $\text{CHR}^{12}$ ; en donde cada  $\text{R}^{12}$  es independientemente F, Cl, Br o alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ , a condición de que esté presente al menos uno de  $Y'$  e  $Y''$ ;

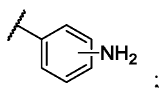
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIa')

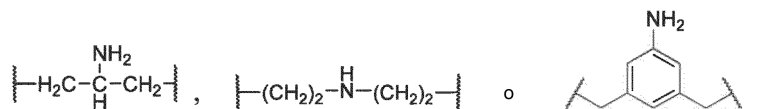
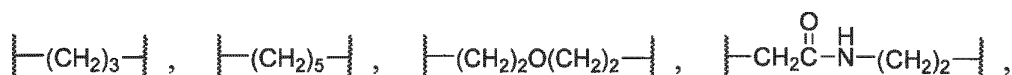


en la que

cada  $\text{R}^9$  es independientemente H, OH, OMe,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NMe}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-8}\text{Me}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  o

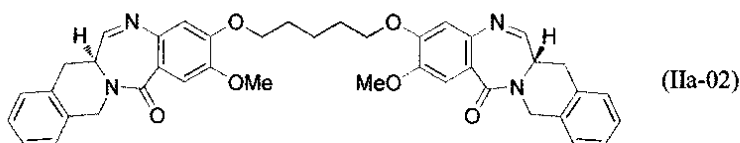
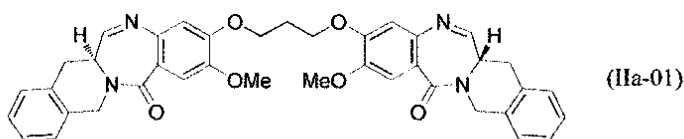


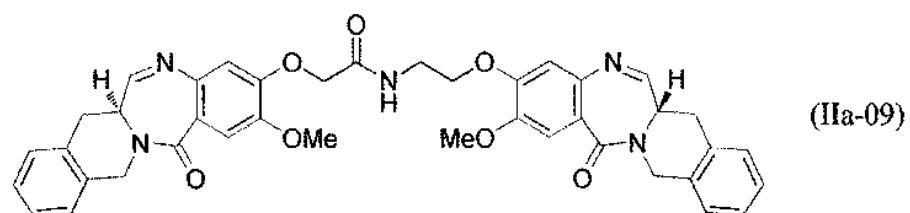
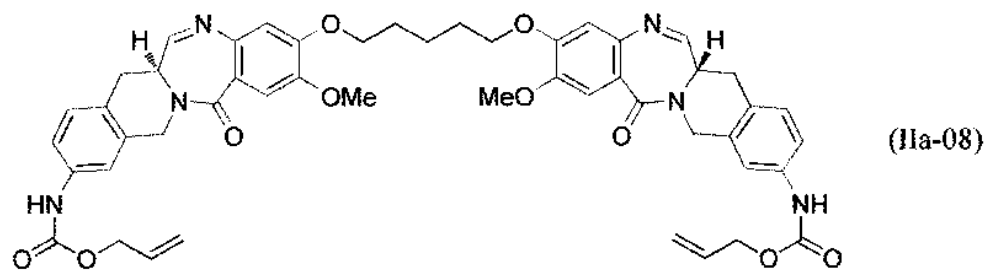
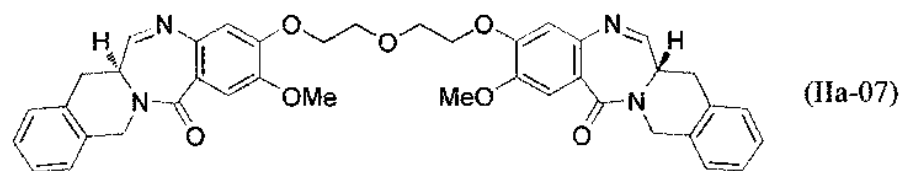
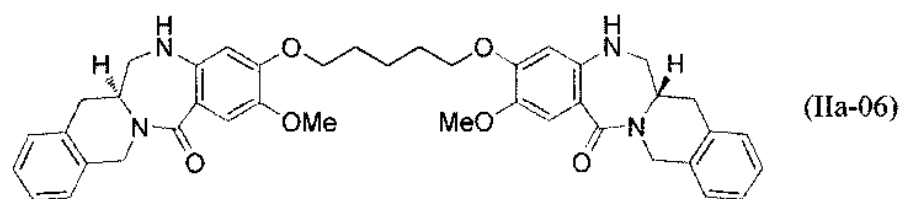
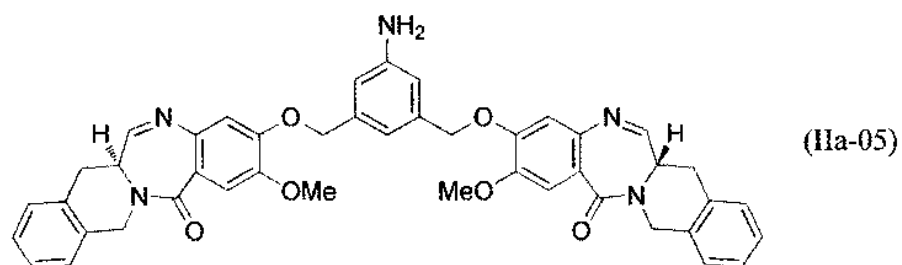
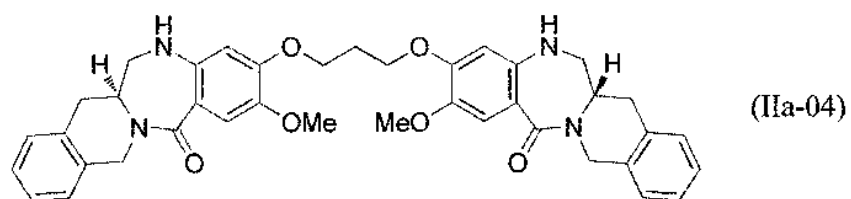
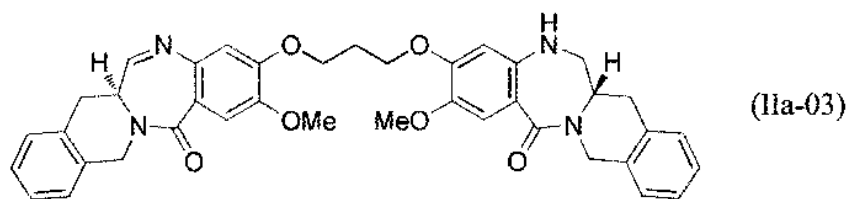
y  
 $X$  es

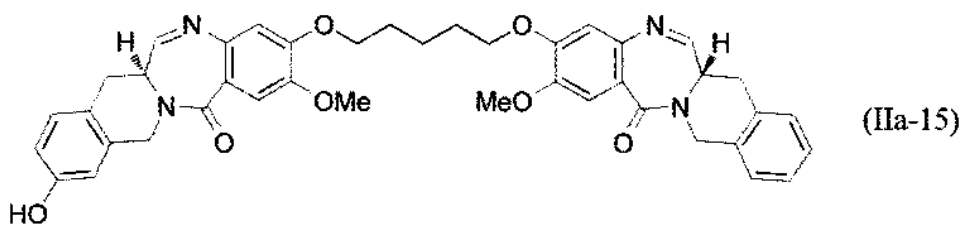
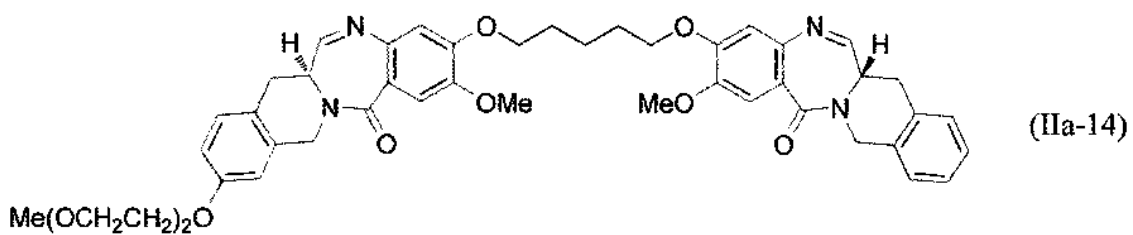
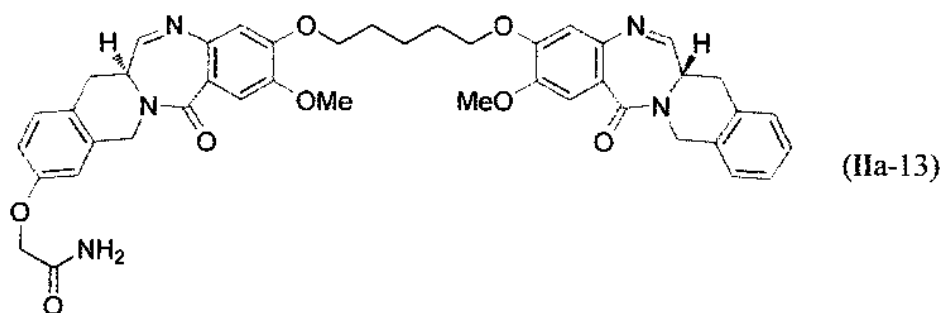
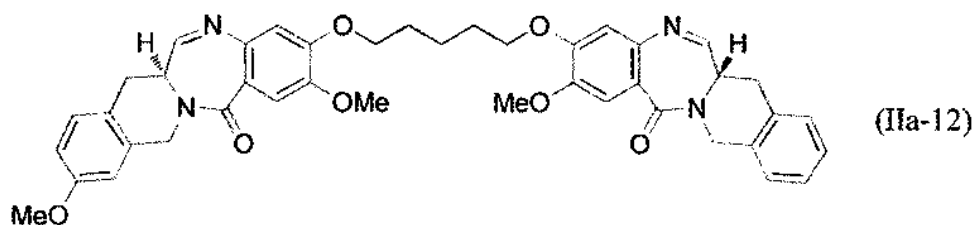
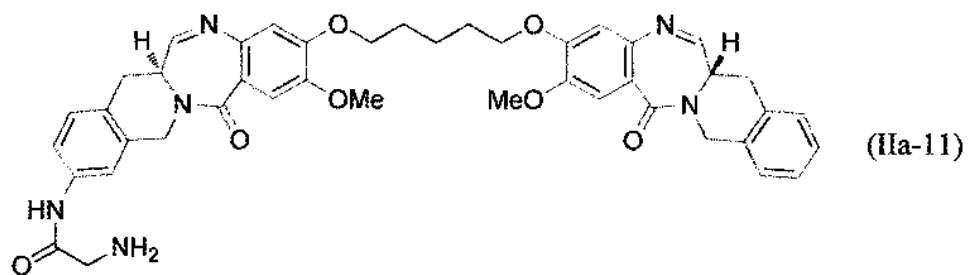
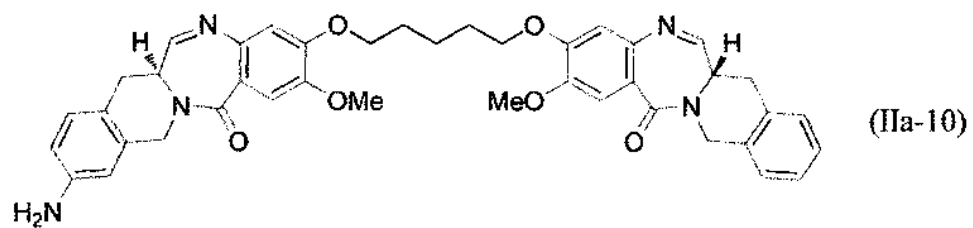


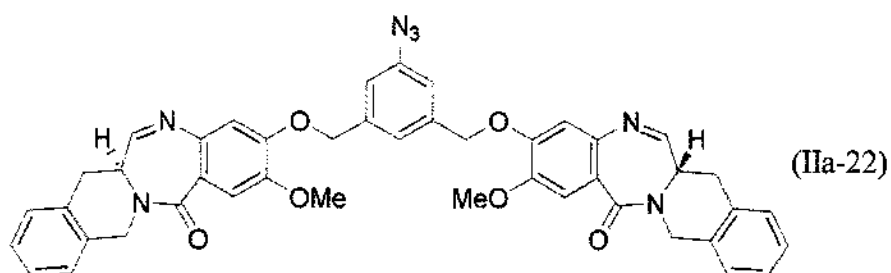
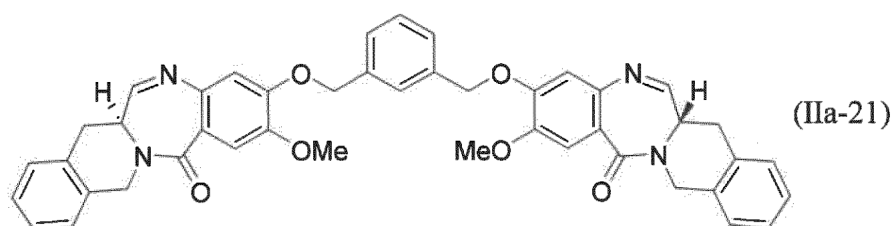
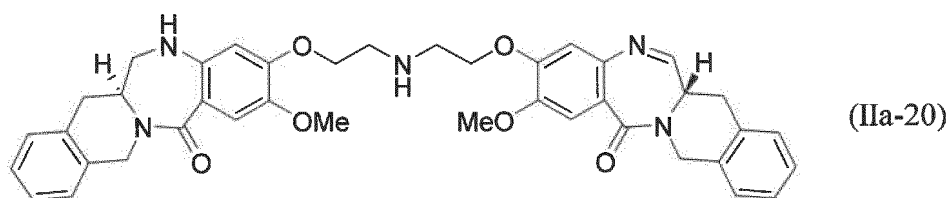
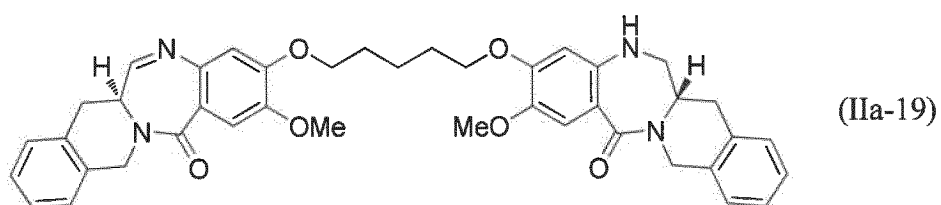
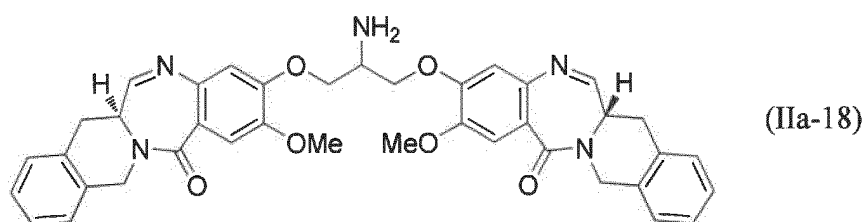
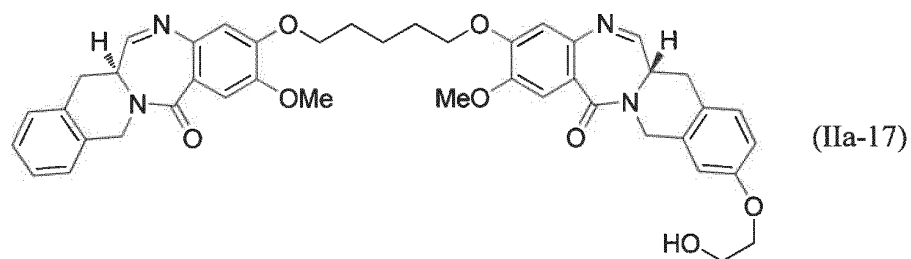
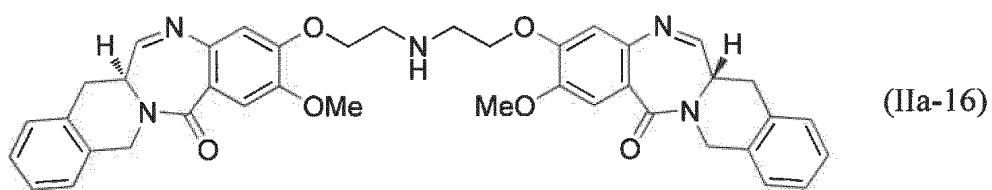
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en



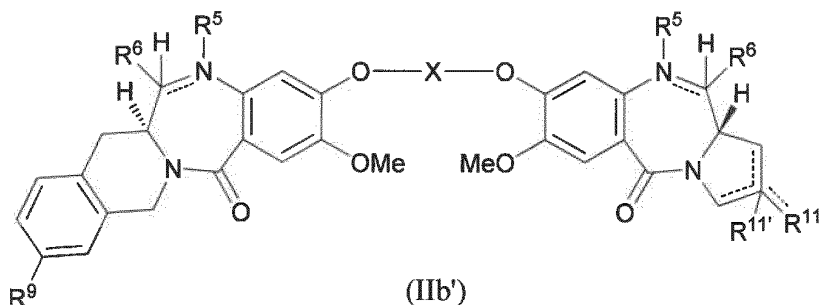






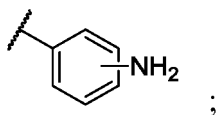
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIb')

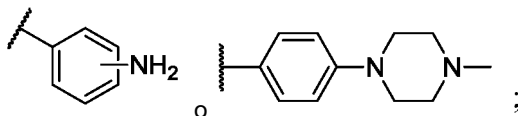


en la que

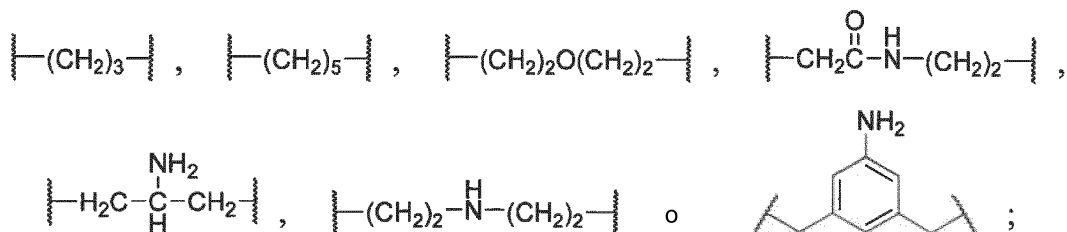
R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o



R<sup>11</sup> es H, =CH<sub>2</sub>, CH=CHMe, =CHMe, C≡CCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,

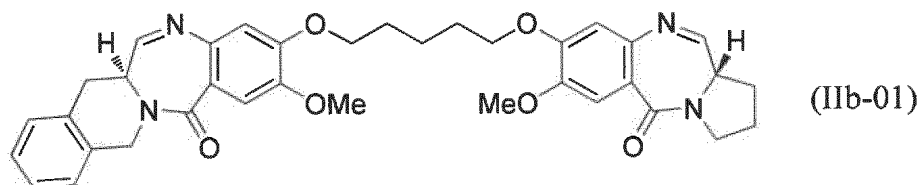


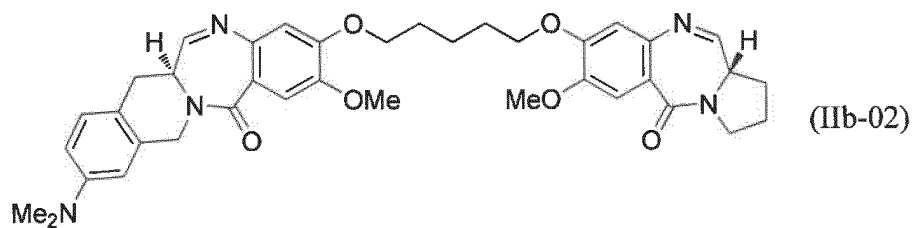
X es



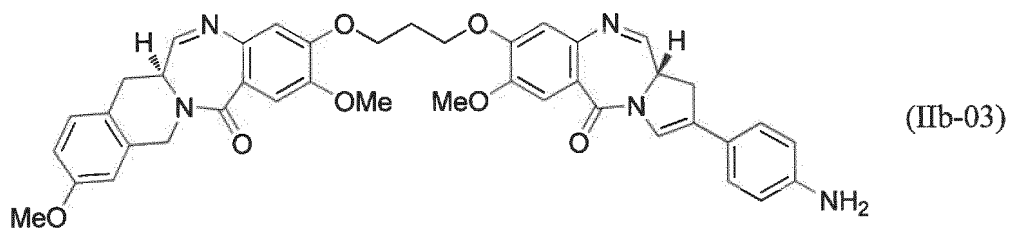
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un dímero de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:





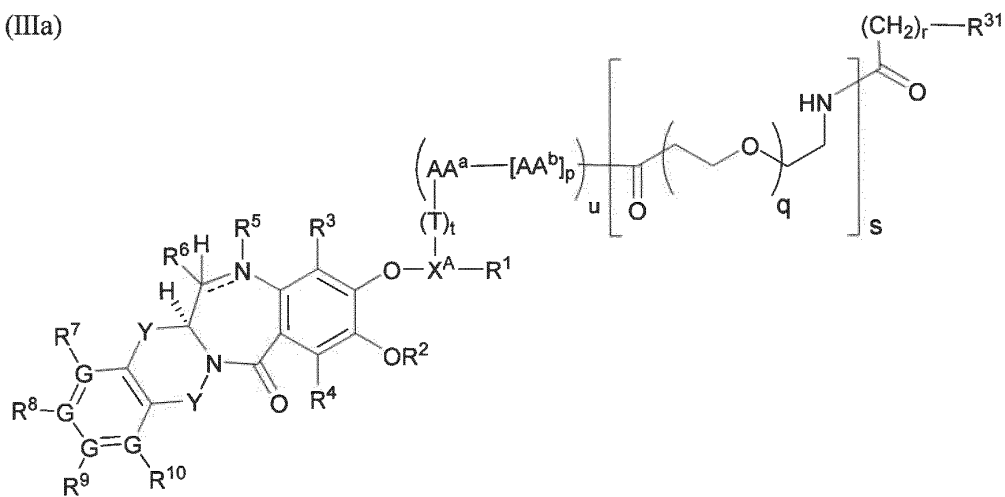
y



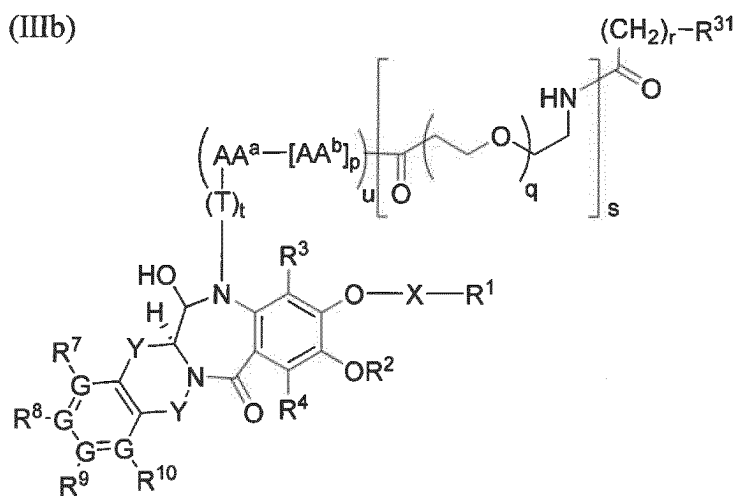
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

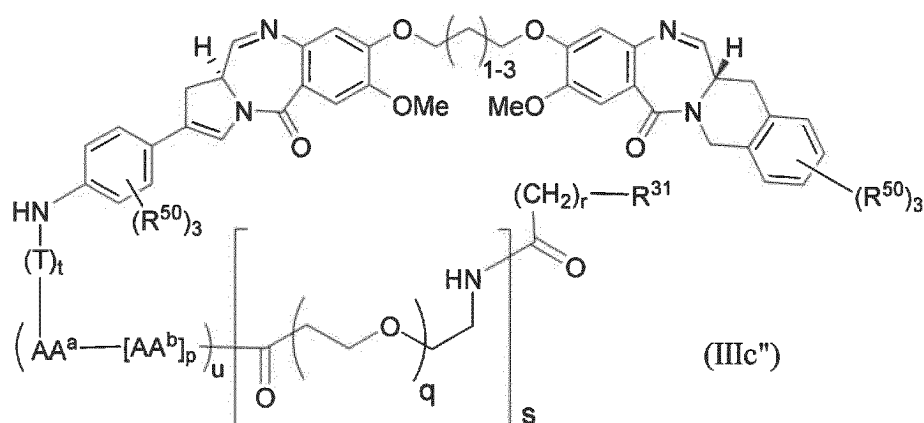
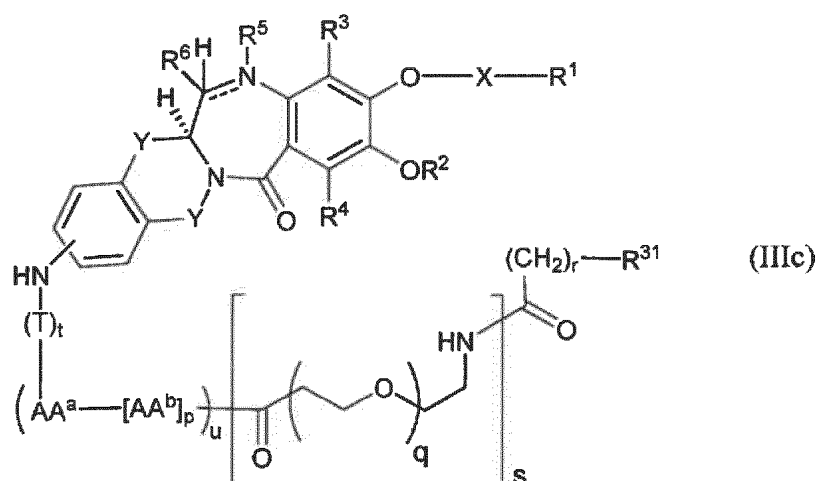
6. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina que tiene una estructura representada por las fórmulas (IIIa), (IIIb), (IIIc) o (IIIc''):

(IIIa)



(IIIb)

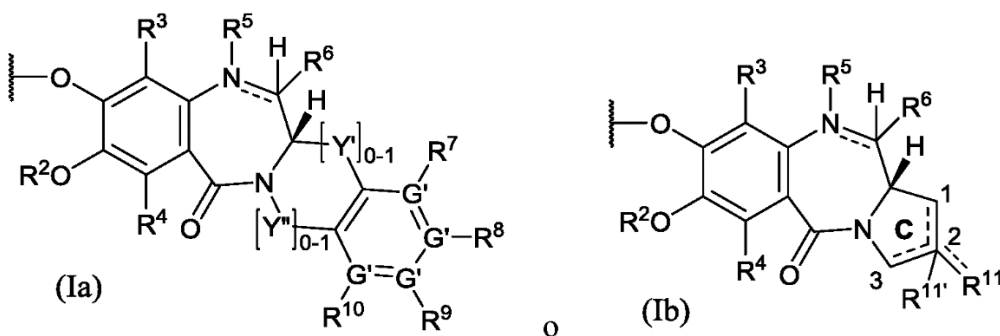




en las que

5

$R^1$  es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):



10

cada  $G$  y  $G'$  es  $C$  o  $N$ , con la condición de que no más de dos  $G$  o dos  $G'$  sean  $N$ ; cada  $R^2$  es independientemente  $H$  o alquilo  $C_1-C_5$ ;

cada  $R^3$  y  $R^4$  es independientemente  $H$ ,  $F$ ,  $Cl$ ,  $Br$ ,  $OH$ , alquilo  $C_1-C_3$ ,  $O$ (alquilo  $C_1-C_3$ ), ciano,  $(CH_2)_{0-5}NH_2$  o  $NO_2$ ;

cada línea doble  $\equiv$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

15

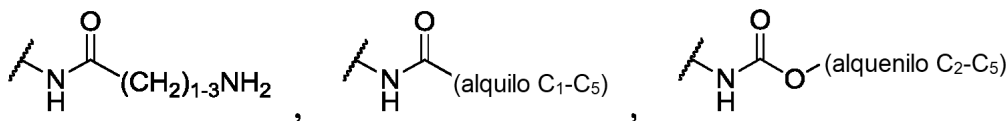
cada  $R^5$  es  $H$  si la línea doble  $\equiv$  al  $N$  al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

cada  $R^6$  es  $H$ ,  $OH$ ,  $SO_3Na$  o  $SO_3K$  si la línea doble  $\equiv$  al  $C$  al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\equiv$  es un doble enlace;

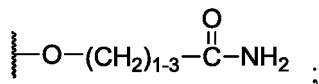
20

cada  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  es independientemente  $H$ , alquilo  $C_1-C_5$ ,  $C\equiv C(CH_2)_{1-5}X^2$ ,  $OH$ ,  $O$ (alquilo  $C_1-C_5$ ), ciano,  $NO_2$ ,  $F$ ,  $Cl$ ,  $Br$ ,  $O(CH_2CH_2O)_{1-8}$ (alquilo  $C_{1-3}$ ),  $(CH_2)_{0-5}X^2$ ,  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ , arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituido con  $(CH_2)_{0-5}X^2$  u  $O(CH_2)_{2-5}X^2$ ;





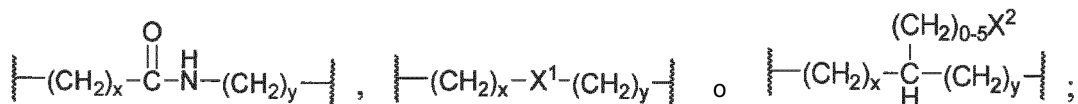
O



o donde un R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> están unidos a un G o G' que es N, tal como R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está ausente; las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula **(Ib)** indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>:

R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup> o arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>:

R<sup>11</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;  
cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquilenos C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquínilo C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN;  
X es



X<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, O, NH, S(O)<sub>0-2</sub>, cicloalqueno o heterocicloalqueno de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arileno de 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, o heteroarileno de 5 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHNH<sub>2</sub> o C(=O)NHNH<sub>2</sub>;

$x$  e  $y$  son independientemente 1, 2 o 3;

cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en donde cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y

Y' e Y "son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en donde cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y";

T es un grupo autoinmolante:

tes 0 o 1;

AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

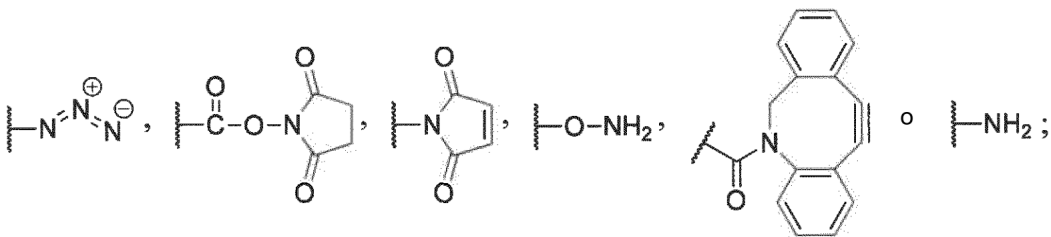
y es 0 o 1:

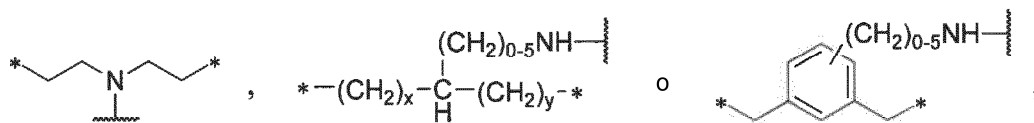
p es 1, 2, 3 o 4;

q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12:

res 1, 2, 3, 4 o 5;

s es 0 o 1;

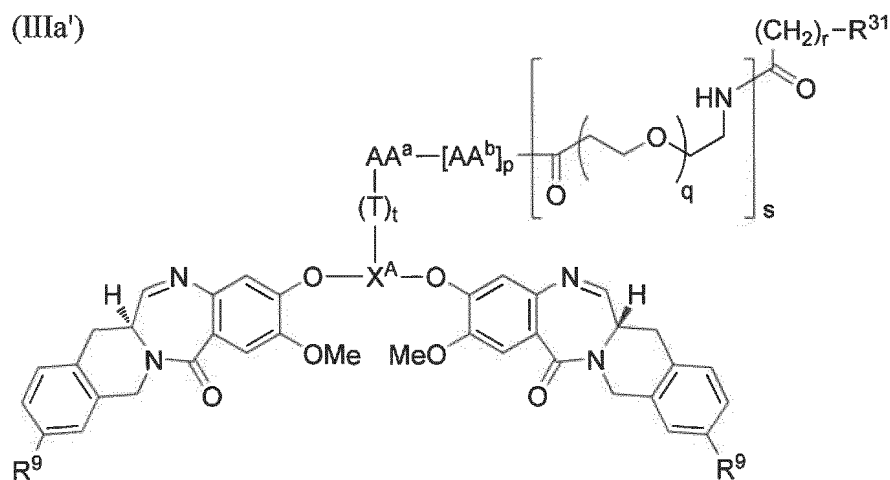
R<sup>31</sup> es $X^A$  es



donde cada x e y es 1, 2 o 3 con la condición de que la suma de x e y es 2 o 4; los asteriscos (\*) indican las posiciones de unión de cada X<sup>A</sup> al O adyacente O y R<sup>1</sup>; y la línea ondulada indica la posición de unión de cada X<sup>A</sup> a T si T está presente o a AA<sup>a</sup> si T está ausente;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

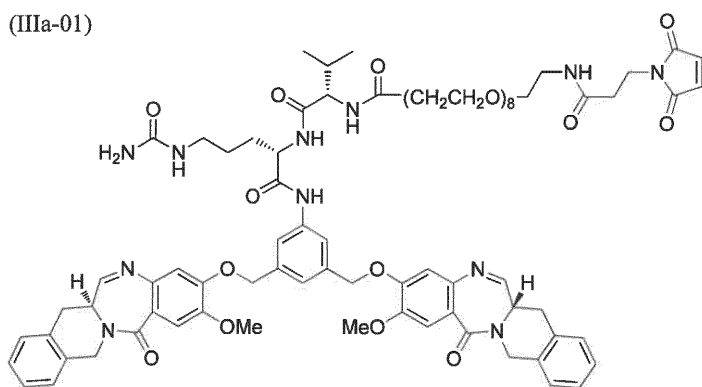
7. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIa')



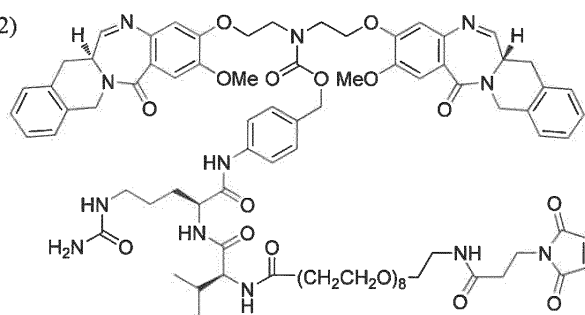
en la que

cada R<sup>9</sup> es independientemente H, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-4</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), OH, Cl, F o Br; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

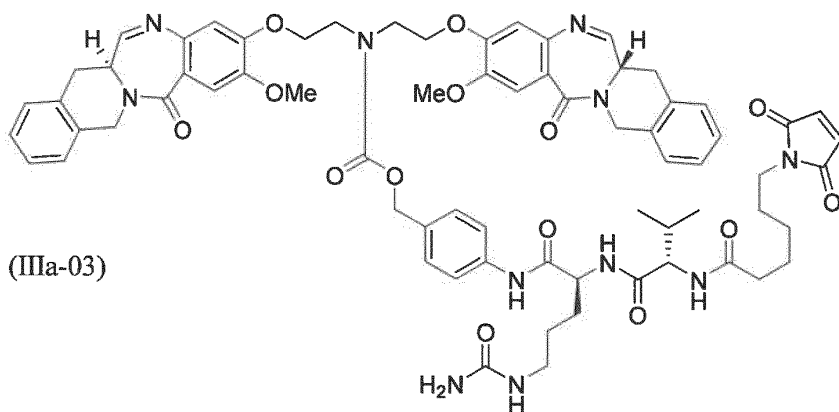
8. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



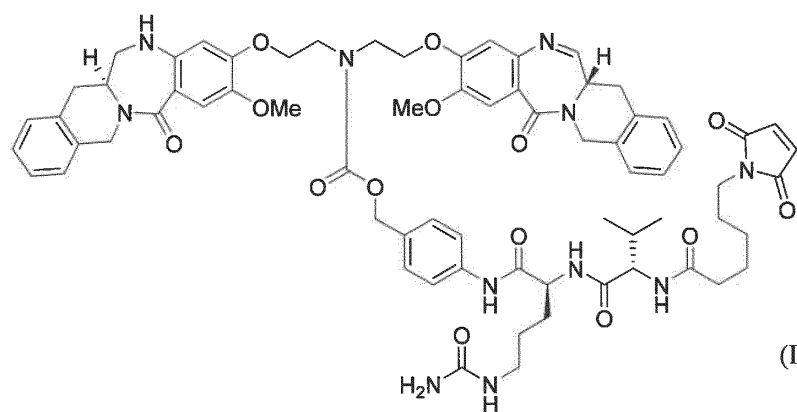
(IIIa-02)



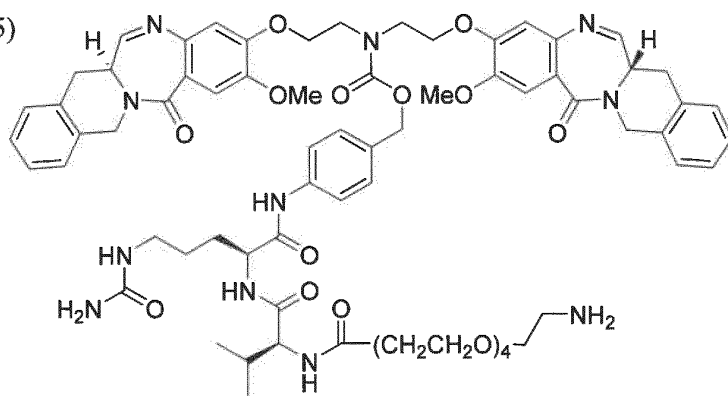
(IIIa-03)



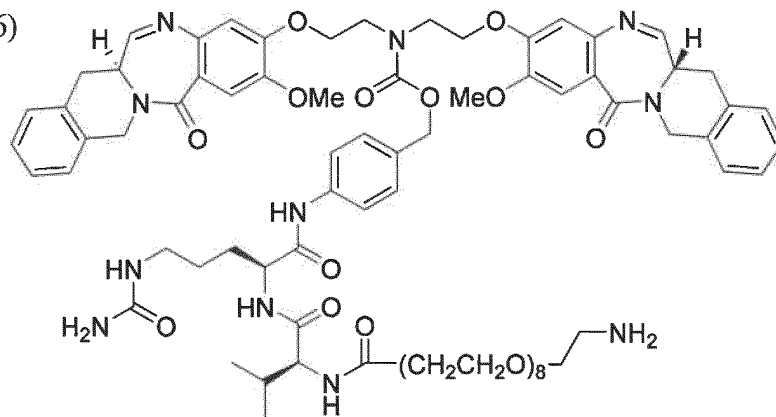
(IIIa-04)



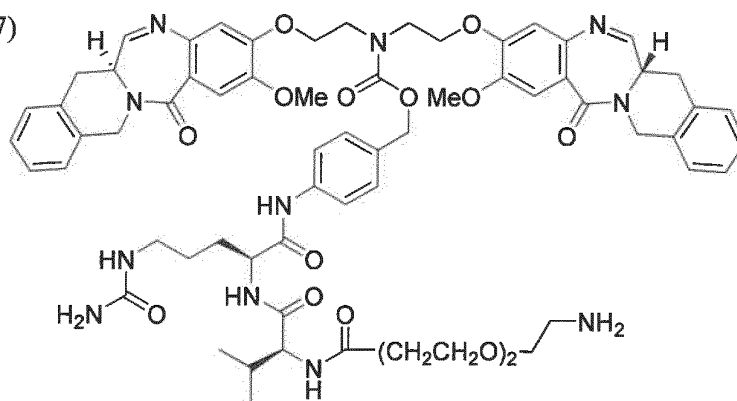
(IIIa-05)



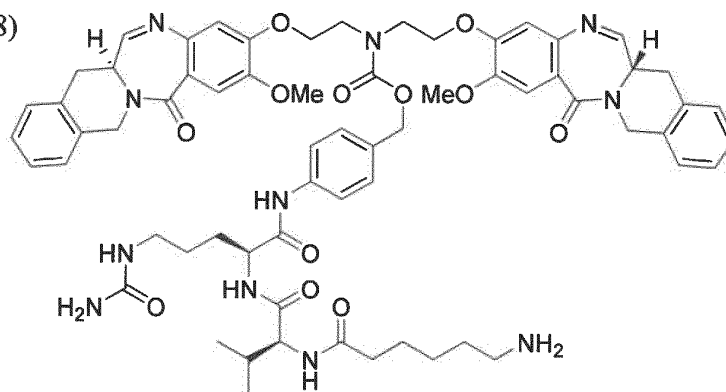
(IIIa-06)



(IIIa-07)

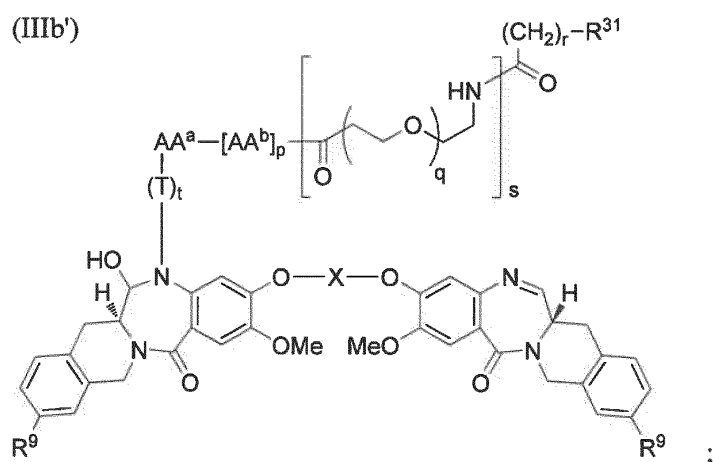


(IIIa-08)



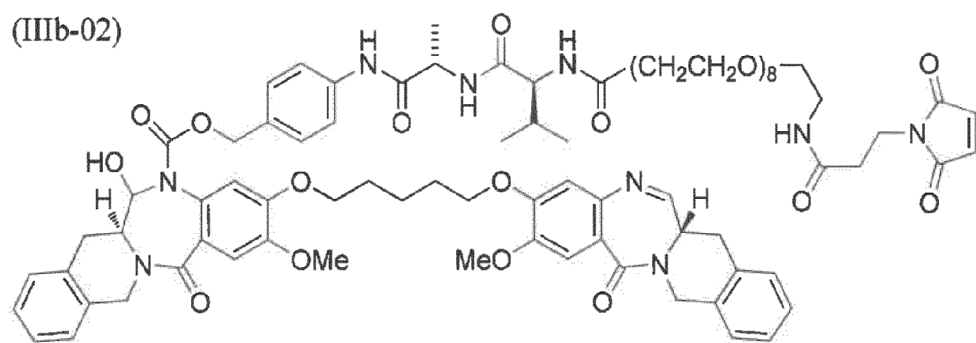
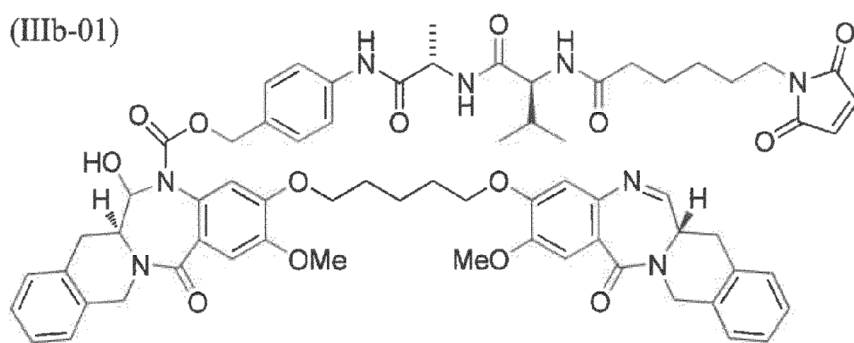
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIb')

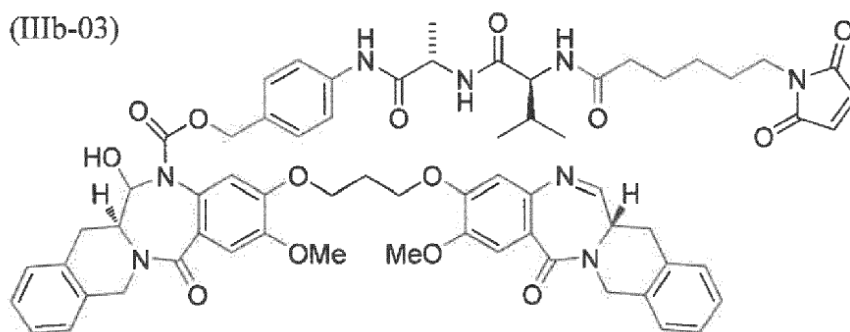


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

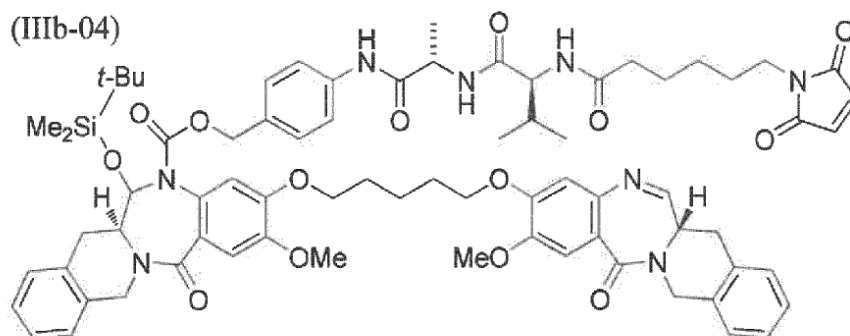
- 5 10. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



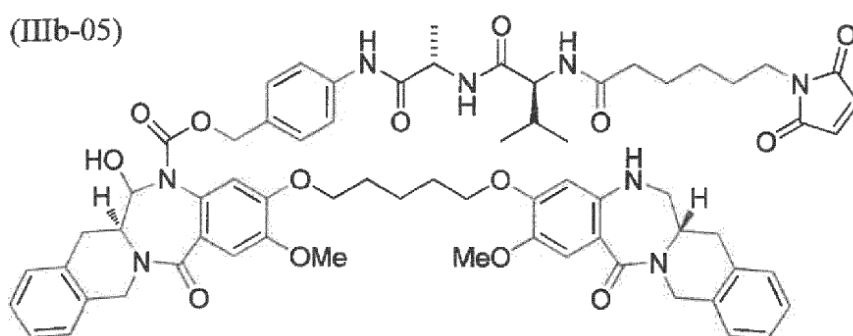
(IIIb-03)



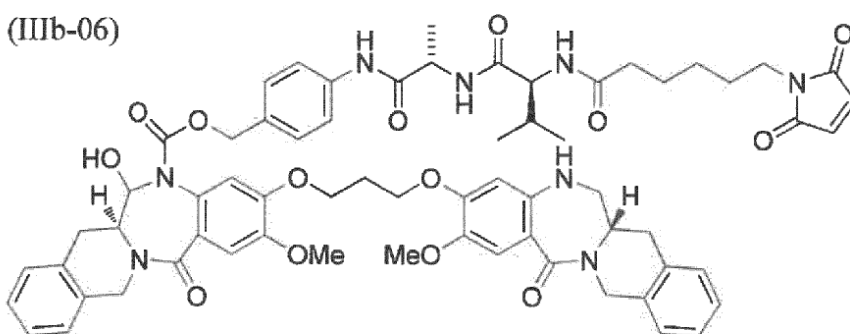
(IIIb-04)

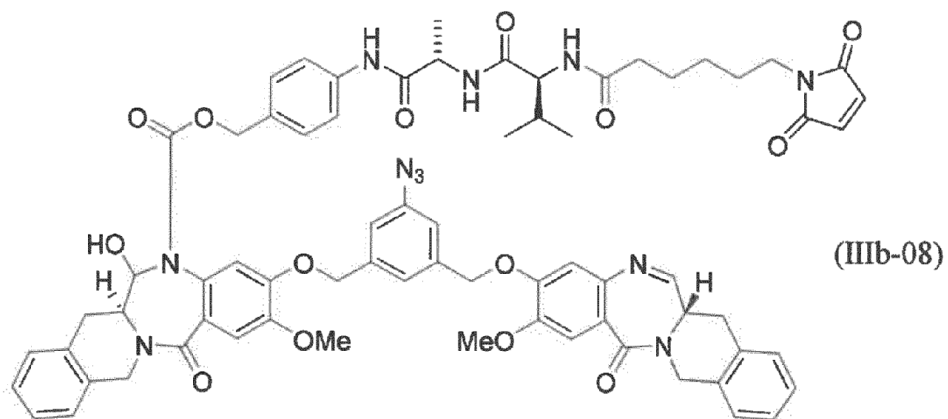
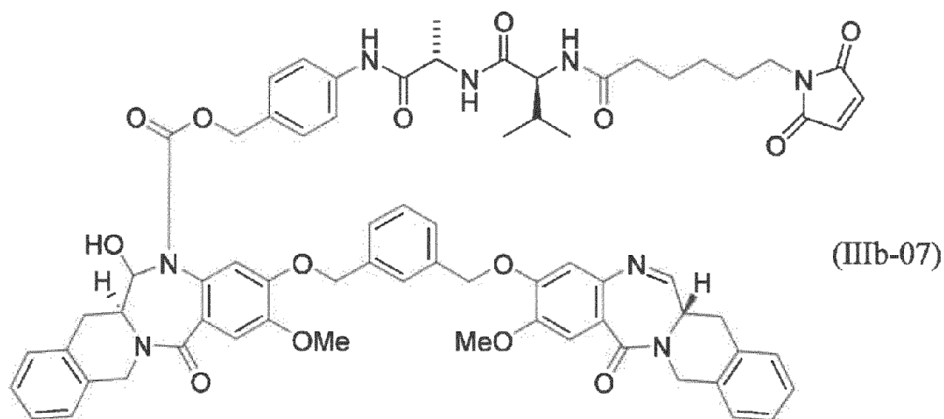


(IIIb-05)

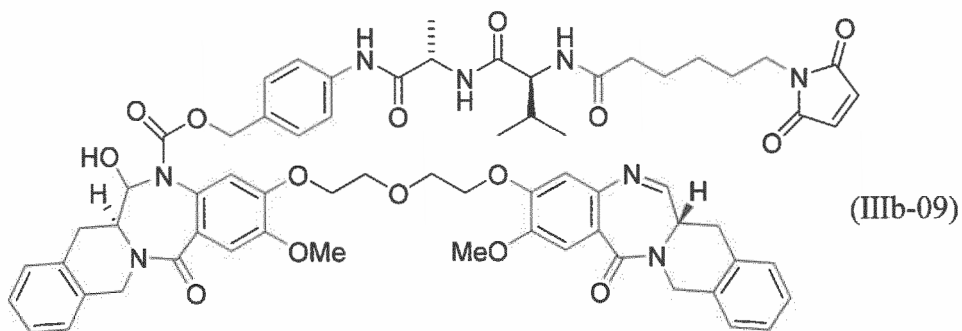


(IIIb-06)





y

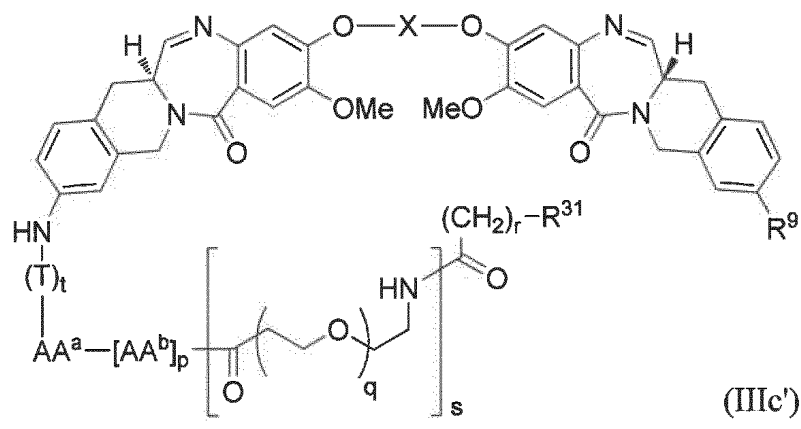


5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Un compuesto dímero-enlazador de benzodiazepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura representada por la fórmula (IIIc')

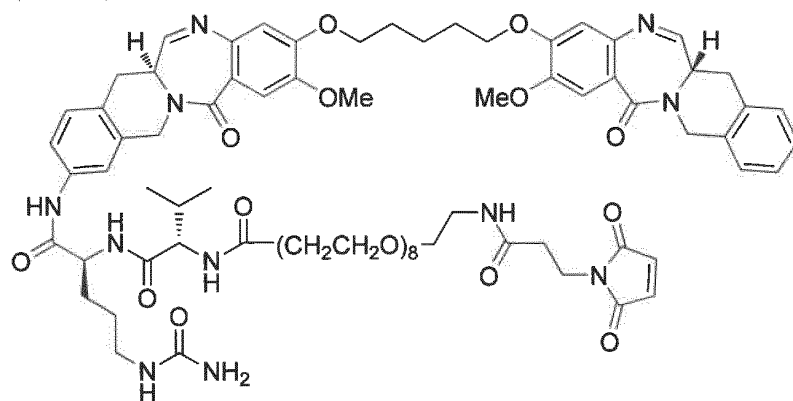
10



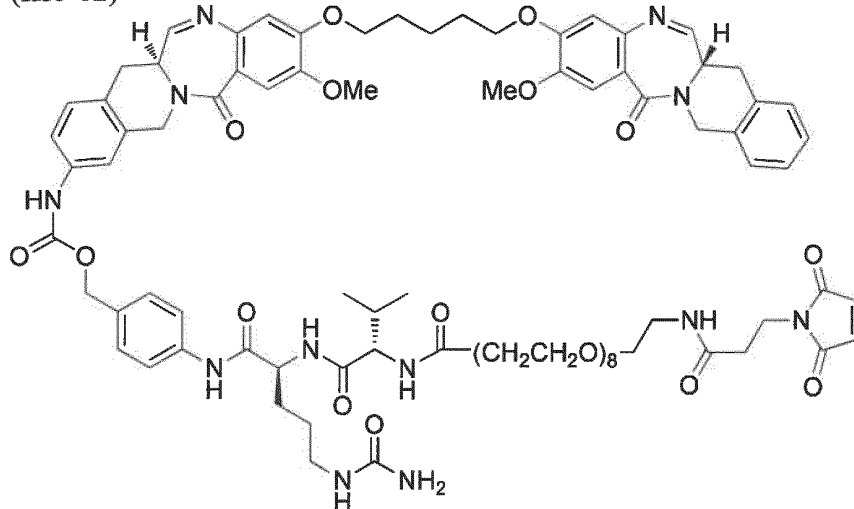
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 12. Un compuesto dímero-enlazador de benzoacepina de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

(IIIc-01)

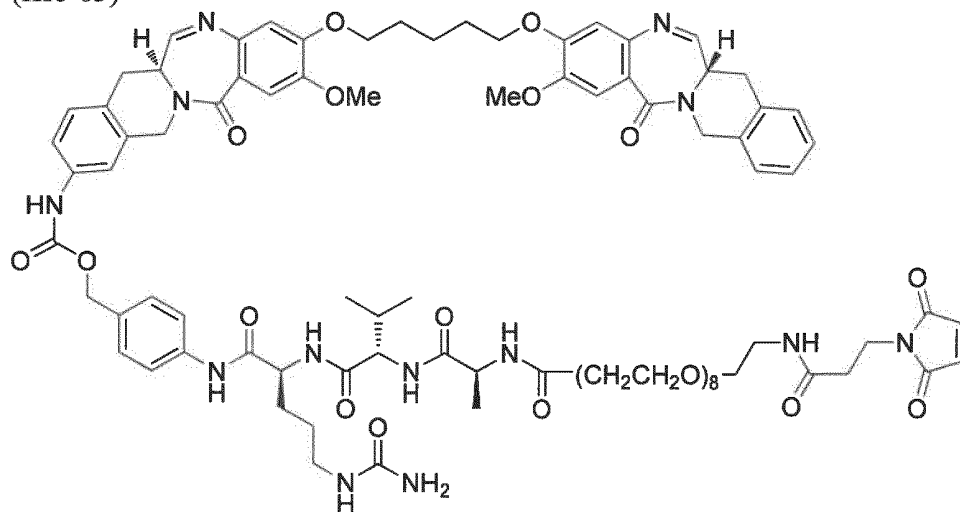


(IIIc-02)

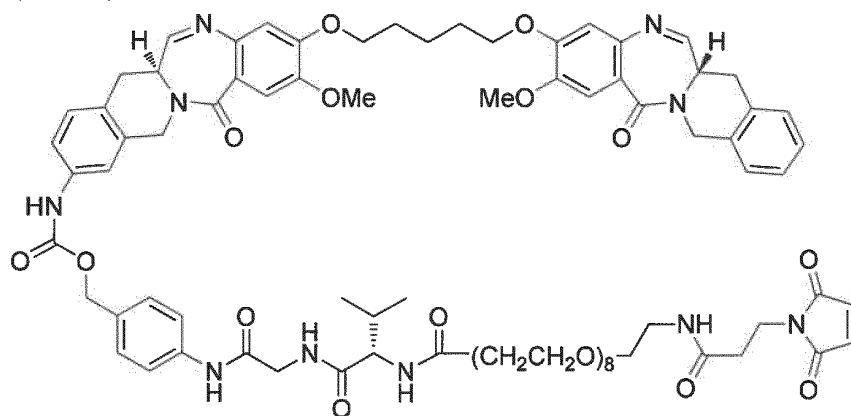




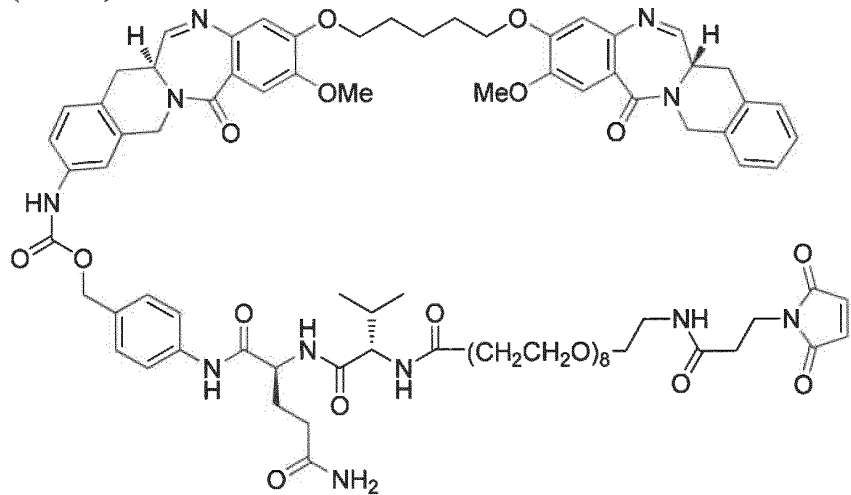
(IIIc-03)



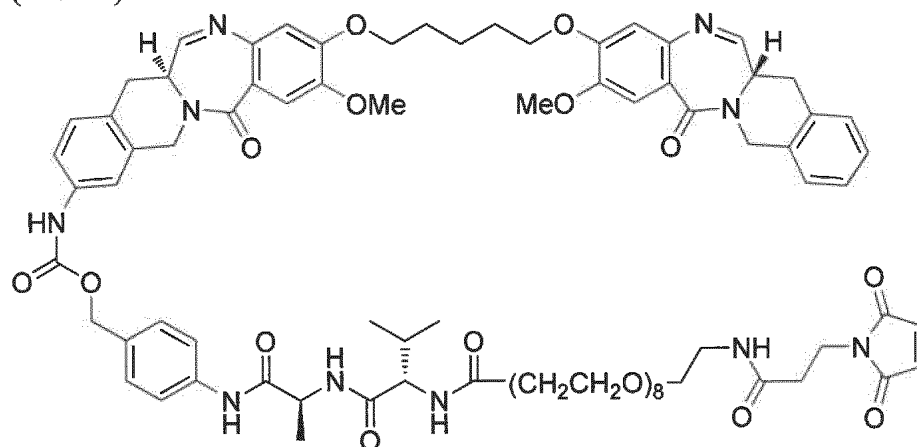
(IIIc-04)



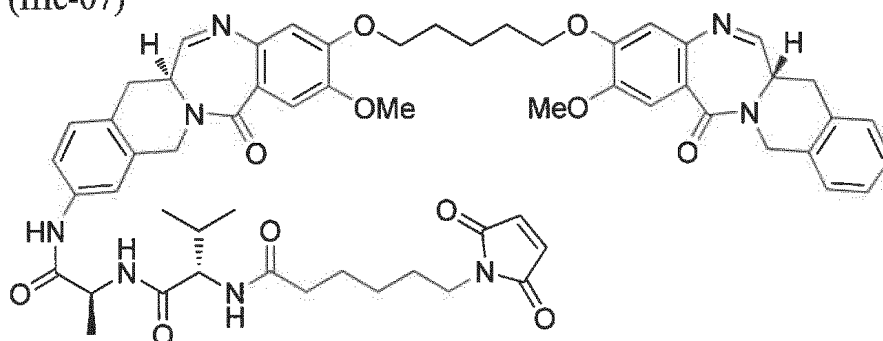
(IIIc-05)



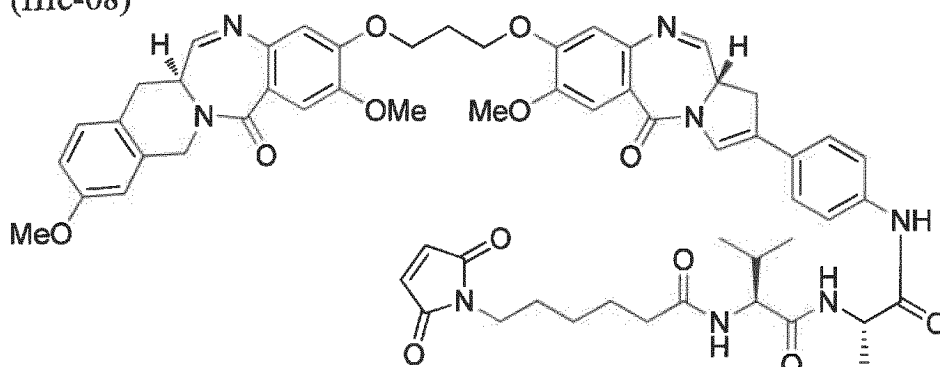
(IIIc-06)



(IIIc-07)



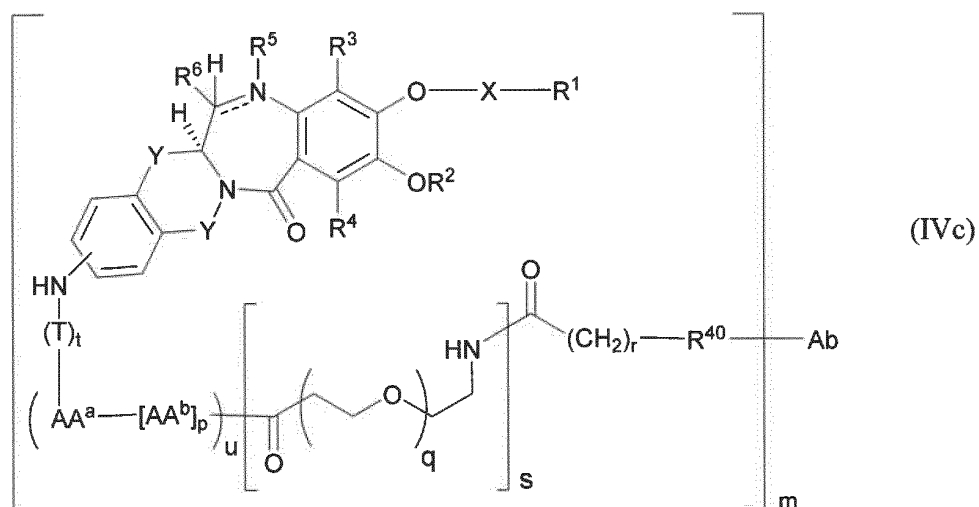
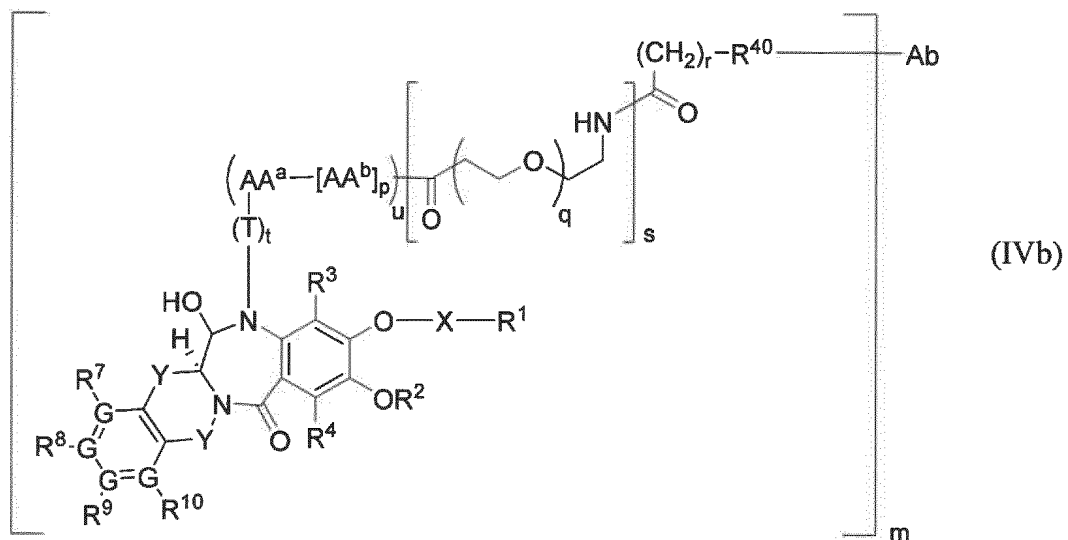
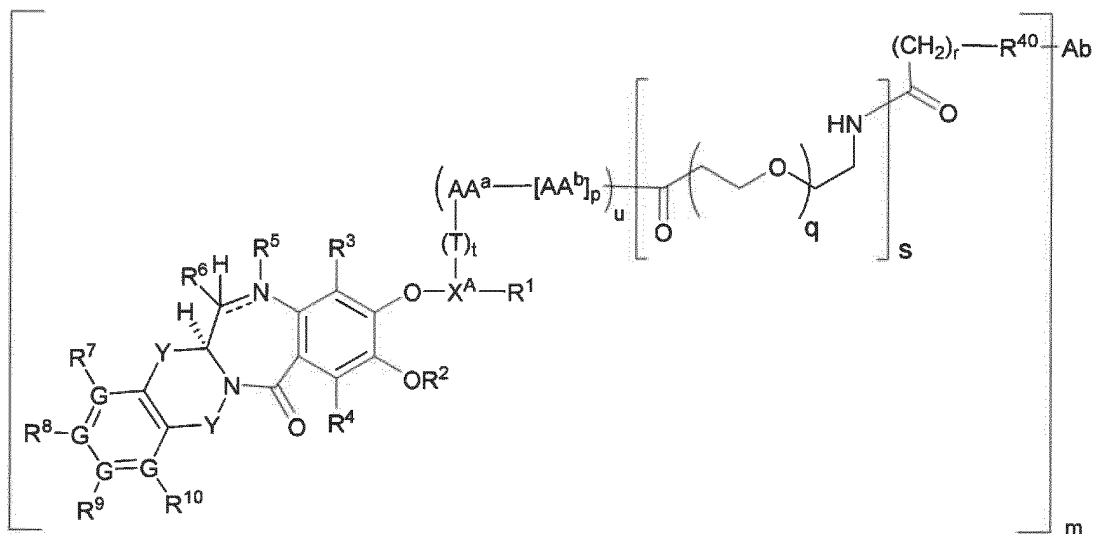
(IIIc-08)

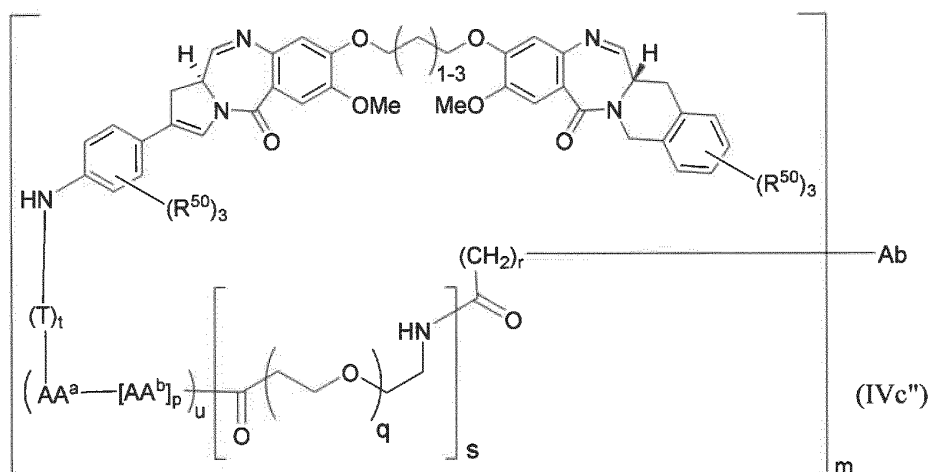


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 13. Un conjugado de un dímero de benzodiazepina y un anticuerpo, que tiene una estructura de acuerdo con las fórmulas (IVa), (IVb), (IVc) o (IVc''):

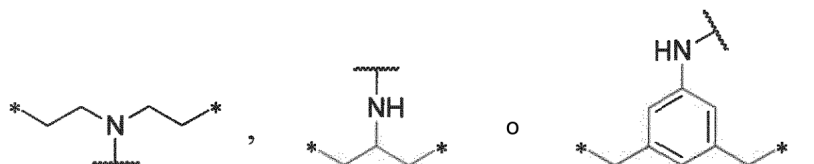
(IVa)



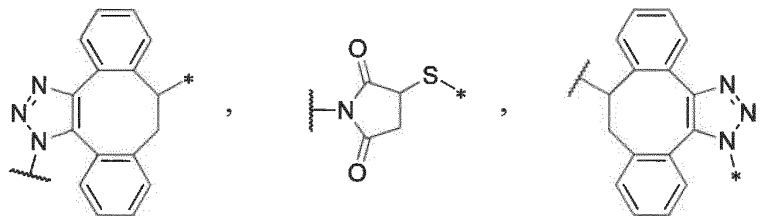


en las que

- 5 Ab es un anticuerpo;  
T es un grupo autoinmolante;  
t es 0 o 1;  
AA<sup>a</sup> y cada AA<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;  
10 u es 0 o 1;  
p es 1, 2, 3 o 4;  
q es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12;  
15 r es 1, 2, 3, 4 o 5;  
s es 0 o 1;  
X<sup>A</sup> es

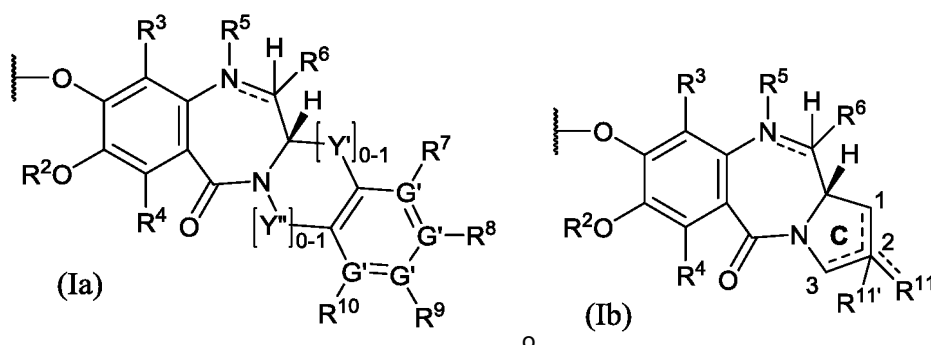


- 20 en las que los asteriscos (\*) indican las posiciones de unión de X<sup>A</sup> a los O adyacentes y la línea ondulada ~~~~~ indica la posición de unión de X<sup>A</sup> a Ti si T está presente o a AA<sup>a</sup> si T está ausente  
R<sup>40</sup> es



- 25
- 
- alquilo C<sub>1-3</sub>

- 30 donde la valencia abierta de R<sup>40</sup> que se une a Ab se indica mediante un asterisco (\*) y la valencia abierta de R<sup>40</sup> que se une a (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> se indica mediante una línea ondulada (~~~~~);  
m es 1, 2, 3 o 4;  
R<sup>1</sup> es de acuerdo con la fórmula (Ia) o la fórmula (Ib):



cada G y G' es C o N, con la condición de que no más de dos G o dos G' sean N;

cada R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

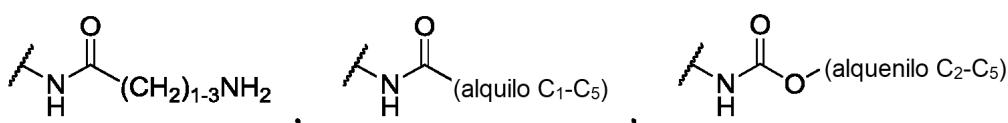
cada R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), ciano, (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>NH<sub>2</sub> o NO<sub>2</sub>;

cada línea doble  $\text{---}$  en un sistema de anillo de diazepina representa independientemente un enlace sencillo o un doble enlace;

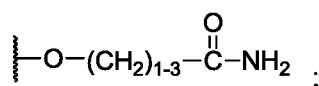
cada R<sup>5</sup> es H si la línea doble  $\text{---}$  al N al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada R<sup>6</sup> es H, OH, SO<sub>3</sub>Na o SO<sub>3</sub>K si la línea doble  $\text{---}$  al C al que está unida es un enlace sencillo y está ausente si la línea doble  $\text{---}$  es un doble enlace;

cada R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>,



o



o donde un R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está unido a un G o G' que es N, tal como R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> o R<sup>10</sup> está ausente;

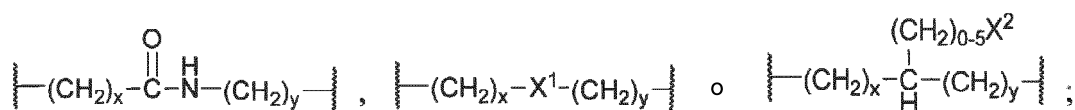
las líneas de puntos en el anillo C de la fórmula (Ib) indican la presencia opcional de un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup>;

R<sup>11</sup> es H, =O, =CH<sub>2</sub>, =CH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, C≡C(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>X<sup>2</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), ciano, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>(alquilo C<sub>1-3</sub>), (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, arilo de 4 a 7 miembros, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, cicloalquilo o heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, o arilo o heteroarilo de 5 a 6 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> u O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

R<sup>11'</sup> está ausente si hay presente un doble enlace C1-C2, C2-C3 o C2-R<sup>11</sup> y de lo contrario es H;

cada R<sup>50</sup> es independientemente H, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), O(alquino C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>), F, Cl, Br o CN;

X es



X<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, O, NH, S(O)<sub>0-2</sub>, cicloalqueno o heterocicloalqueno de 3 a 7 miembros sin sustituir o sustituidos con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, arileno de 6 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>, heteroarileno de 5 miembros sin sustituir o sustituido con (CH<sub>2</sub>)<sub>0-5</sub>X<sup>2</sup> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>2-5</sub>X<sup>2</sup>;

cada X<sup>2</sup> es independientemente H, F, Cl, Br, OH, O(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), O(alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), CO<sub>2</sub>H, N<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NH<sub>2</sub>, NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, SH, CHO, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), NHNH<sub>2</sub> o C(=O)NHNH<sub>2</sub>;

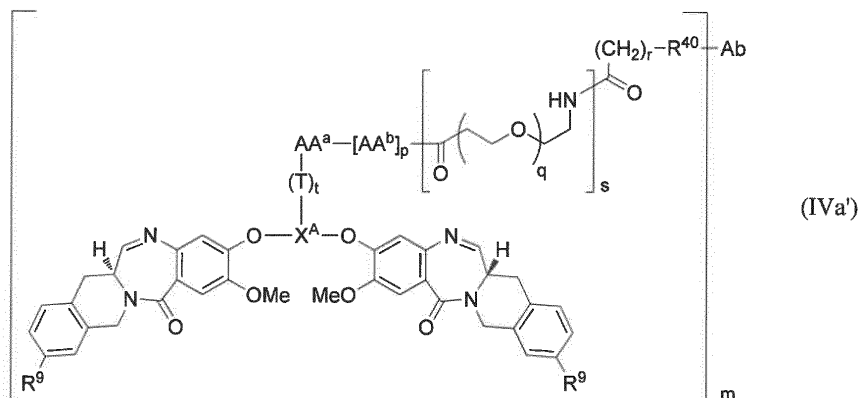
x e y son independientemente 1, 2 o 3;

cada Y es independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>, en donde cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y

Y' e Y'' son independientemente CH<sub>2</sub>, C=O o CHR<sup>12</sup>; en donde cada R<sup>12</sup> es independientemente F, Cl, Br o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, a condición de que esté presente al menos uno de Y' e Y'';

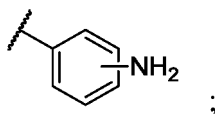
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

14. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVa')



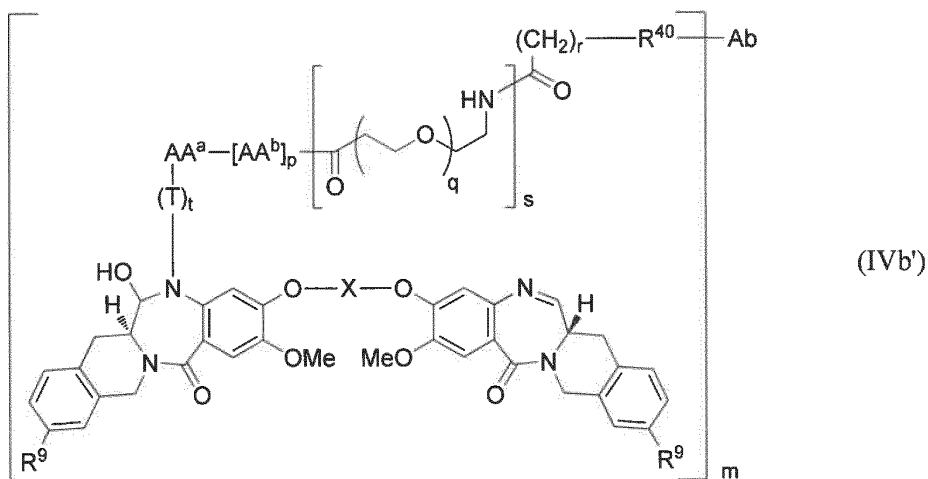
en la que

cada R<sup>9</sup> es independientemente H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o



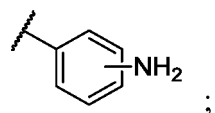
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVb')



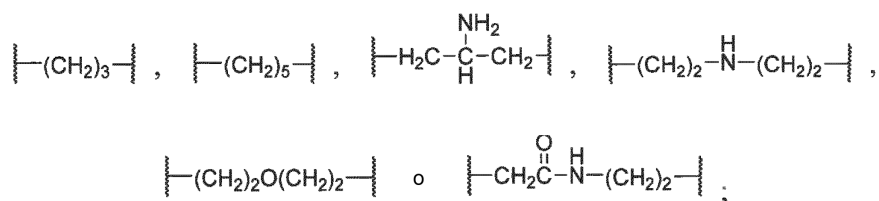
en la que

R<sup>9</sup> es H, OH, OMe, NH<sub>2</sub>, NMe<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-8</sub>Me, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH o



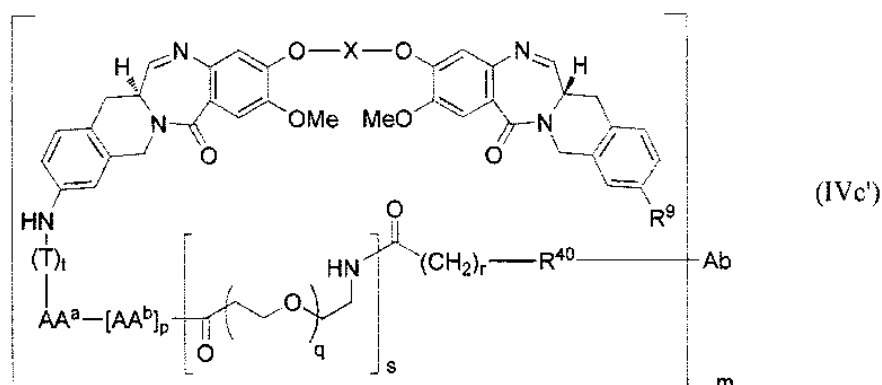
y

X es



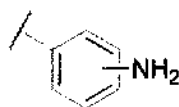
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

16. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 13, que tiene una estructura representada por la fórmula (IVc')



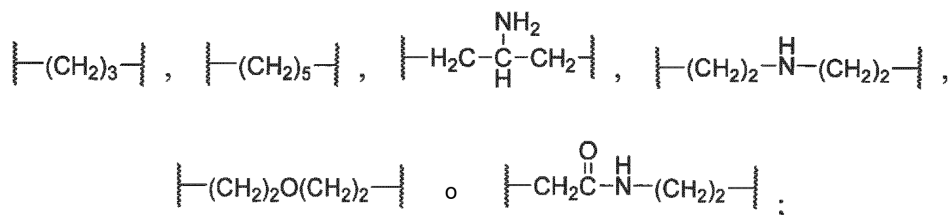
10 en la que

$R^9$  es H, OH, OMe,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NMe}_2$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-8}\text{Me}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  o



15

y  
X es



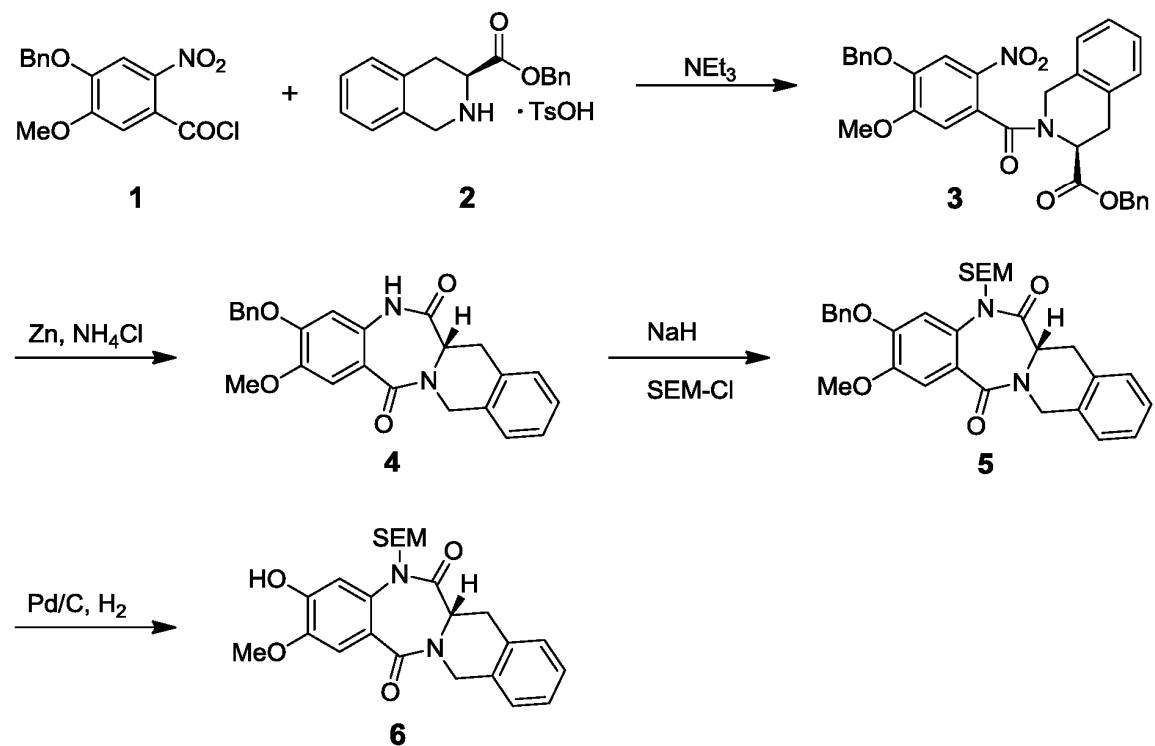
20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

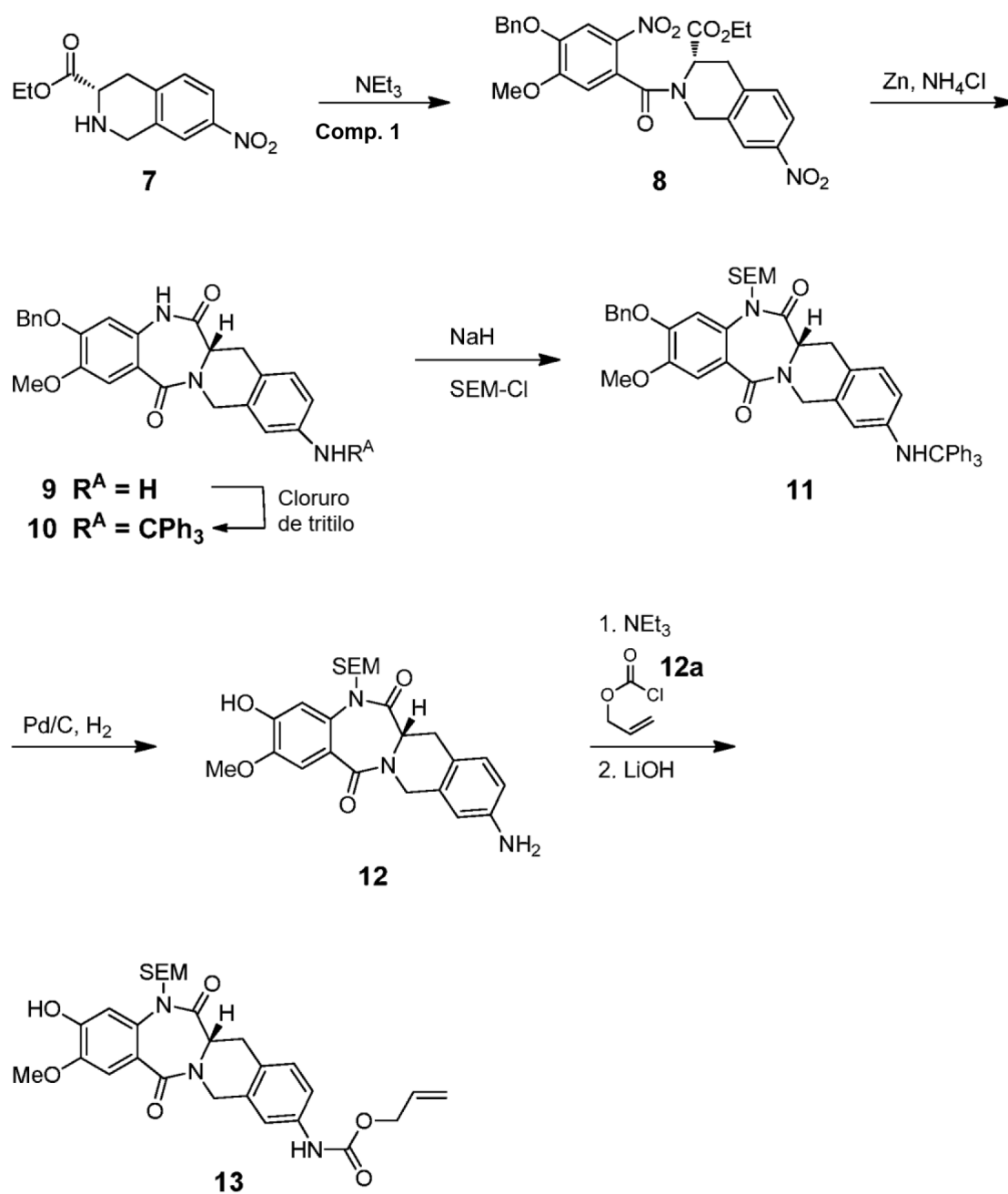
17. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

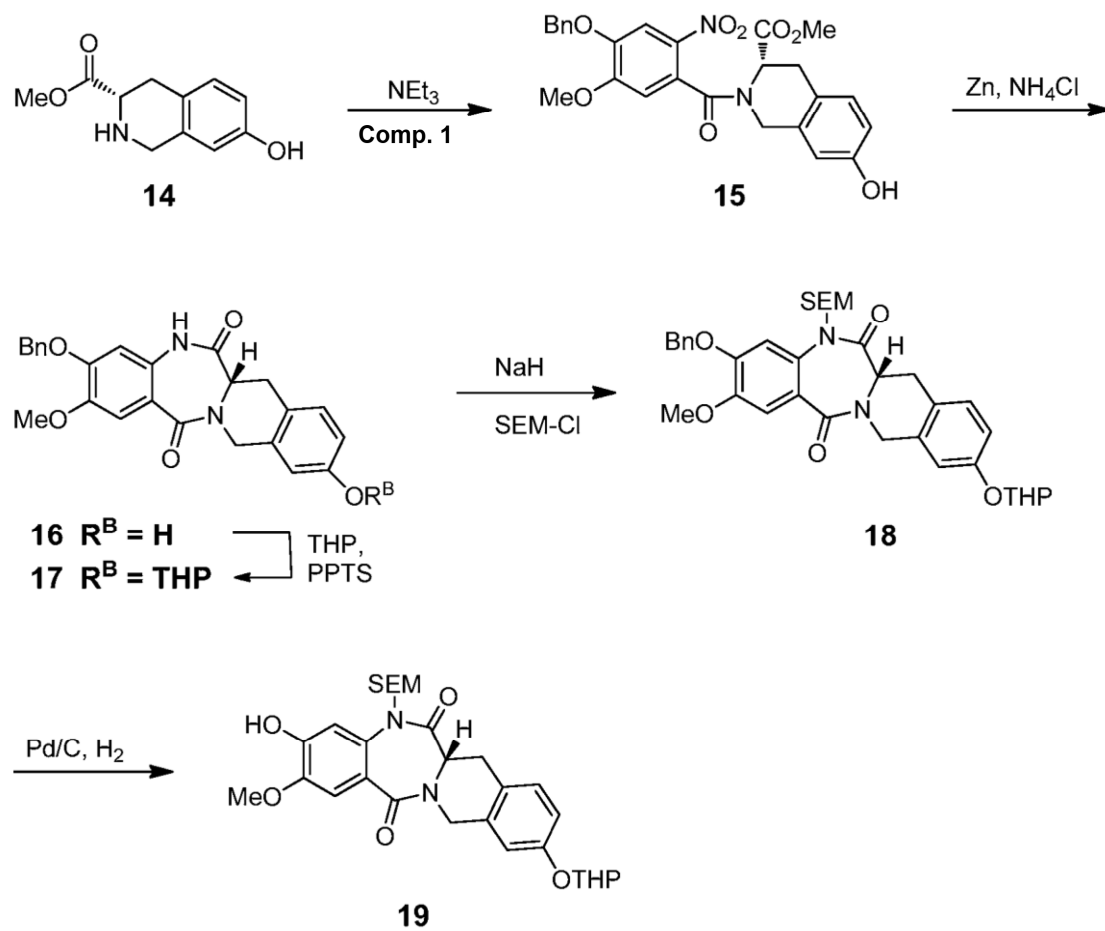
18. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer.

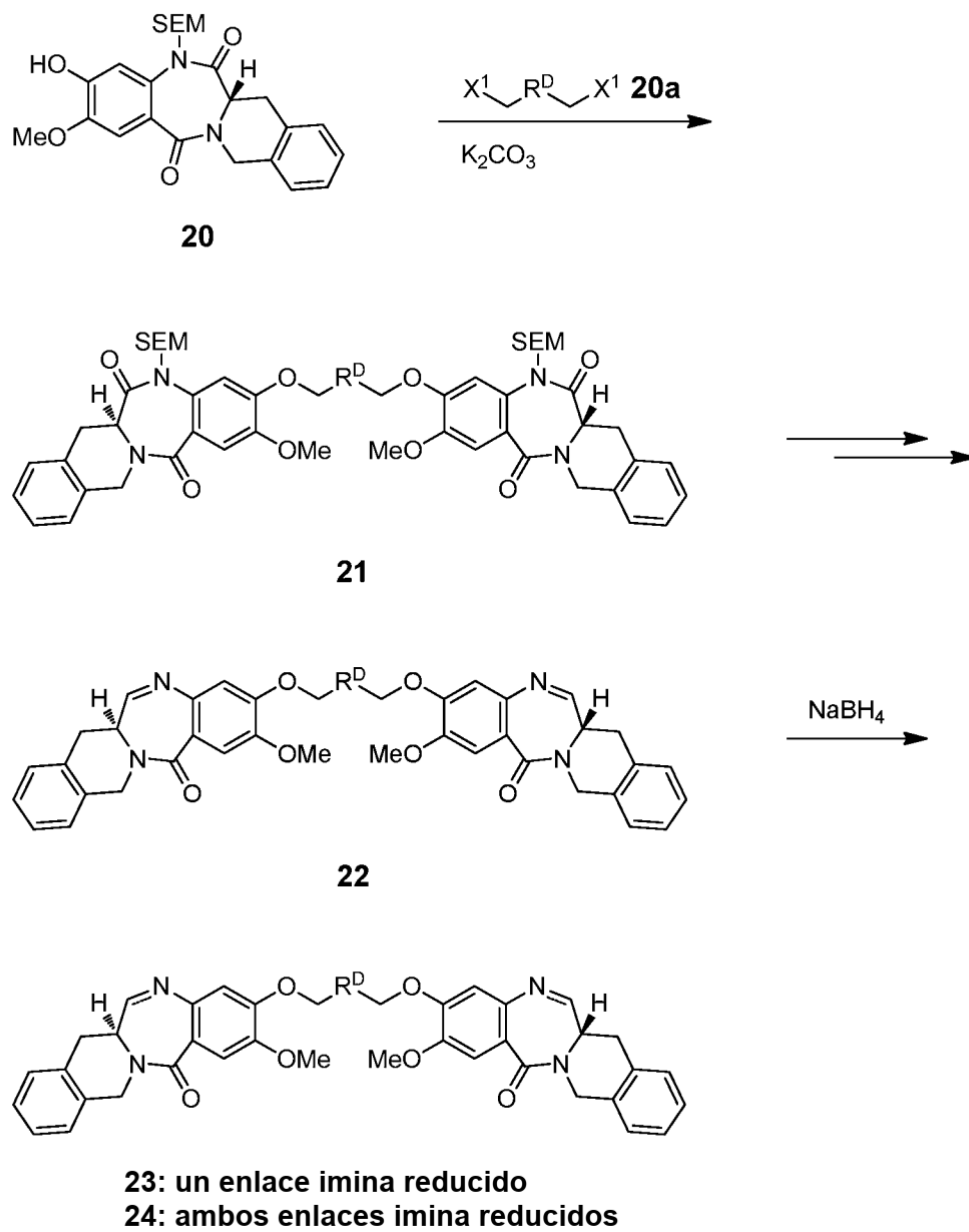
19. El conjugado o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el cáncer es cáncer de pulmón, de ovario, gástrico, renal o de hígado.

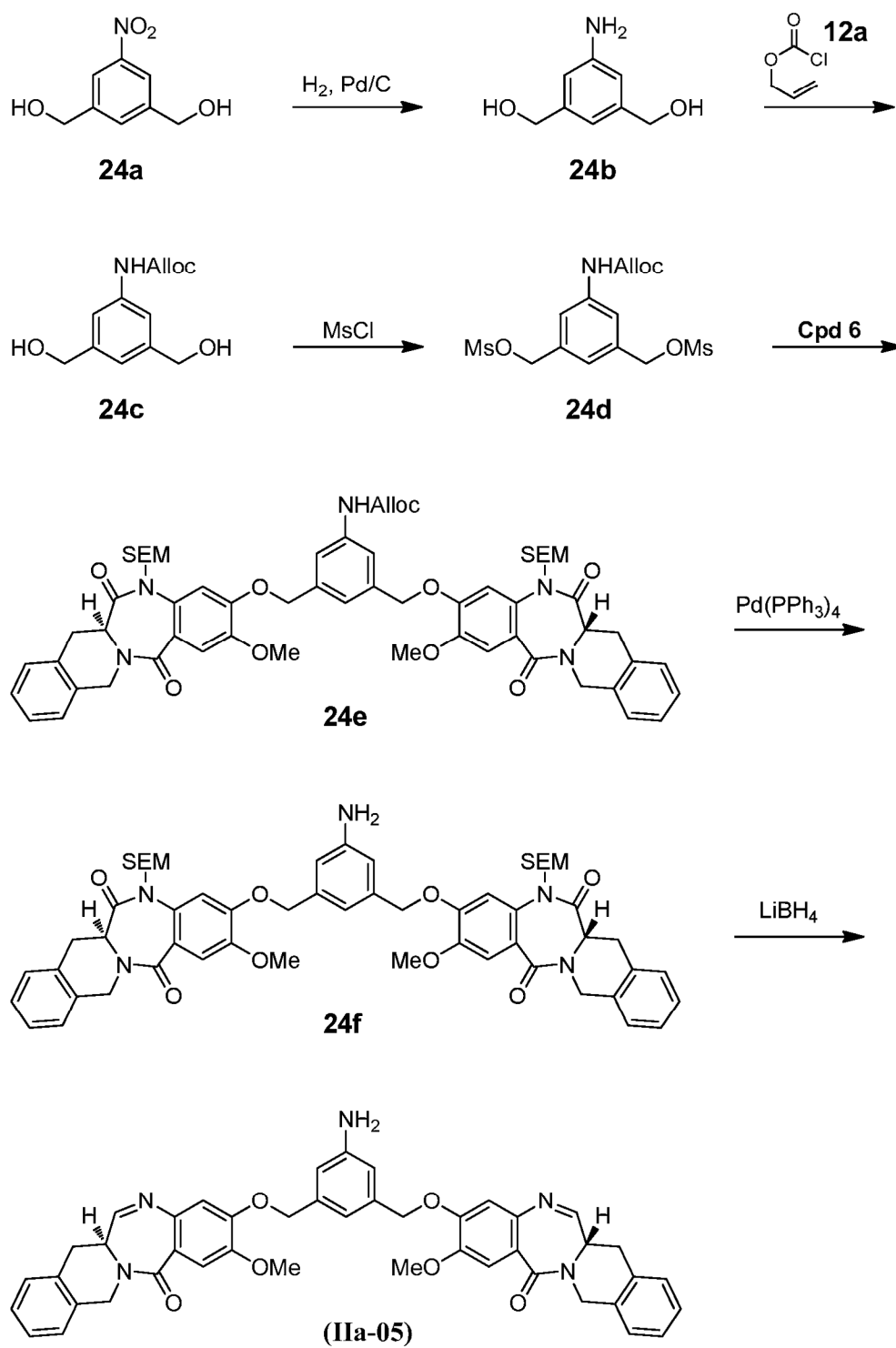
**Fig. 1**

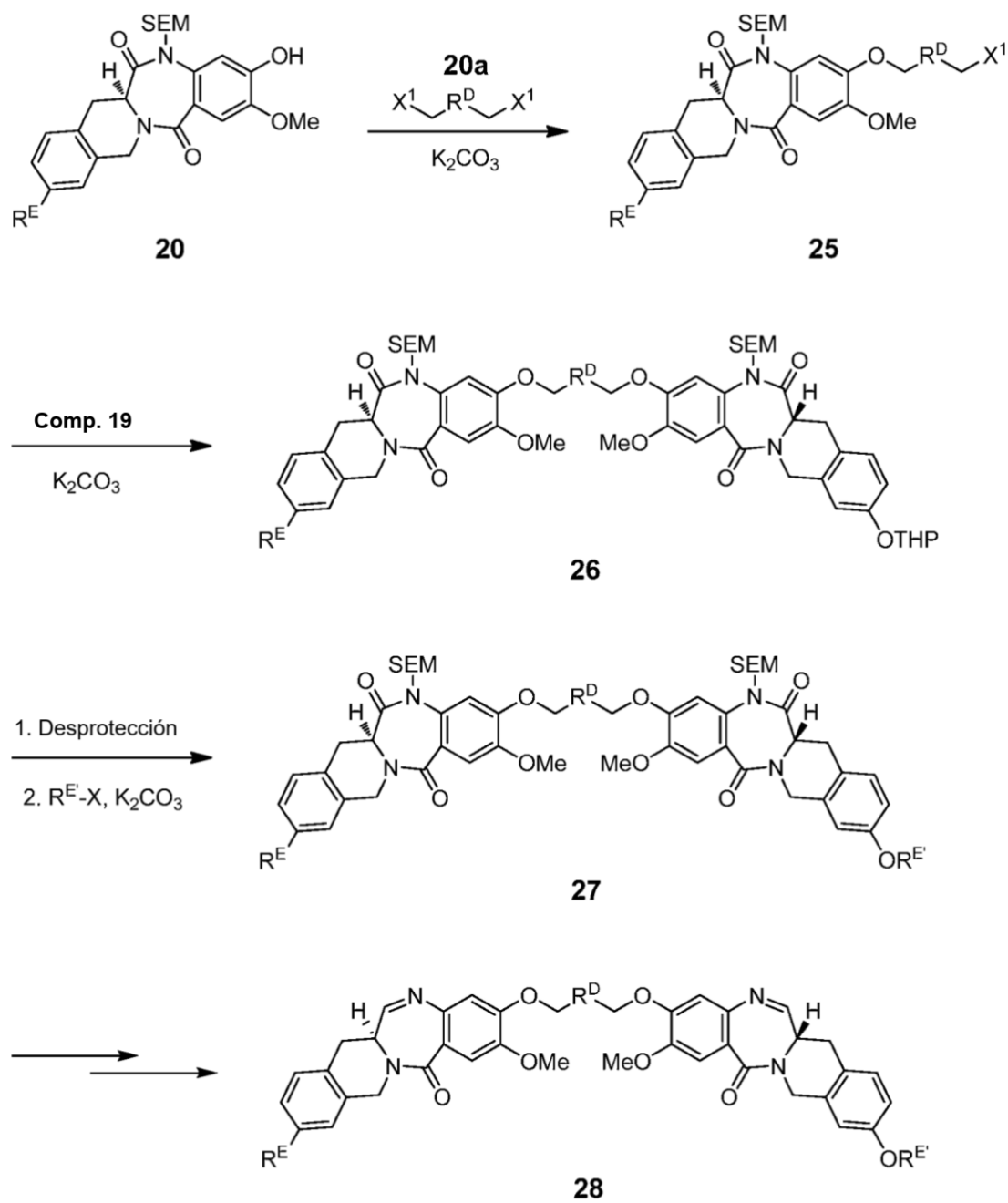


**Fig. 2**

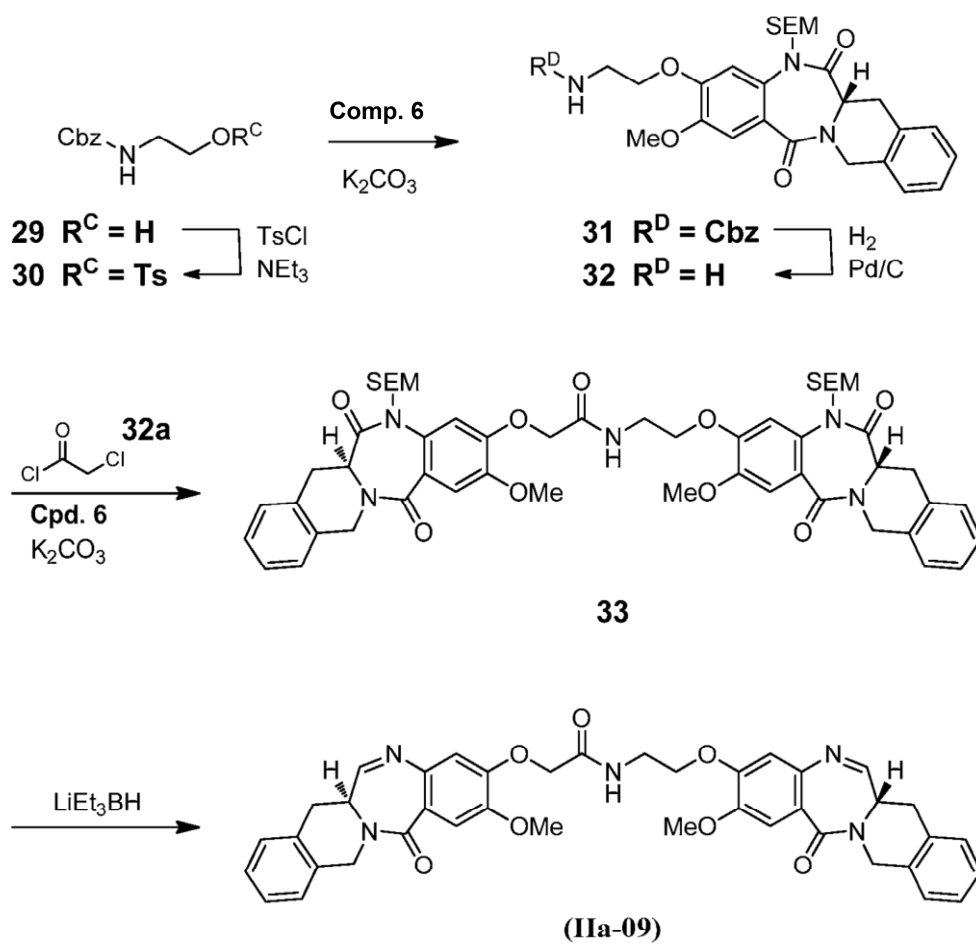
**Fig. 3**

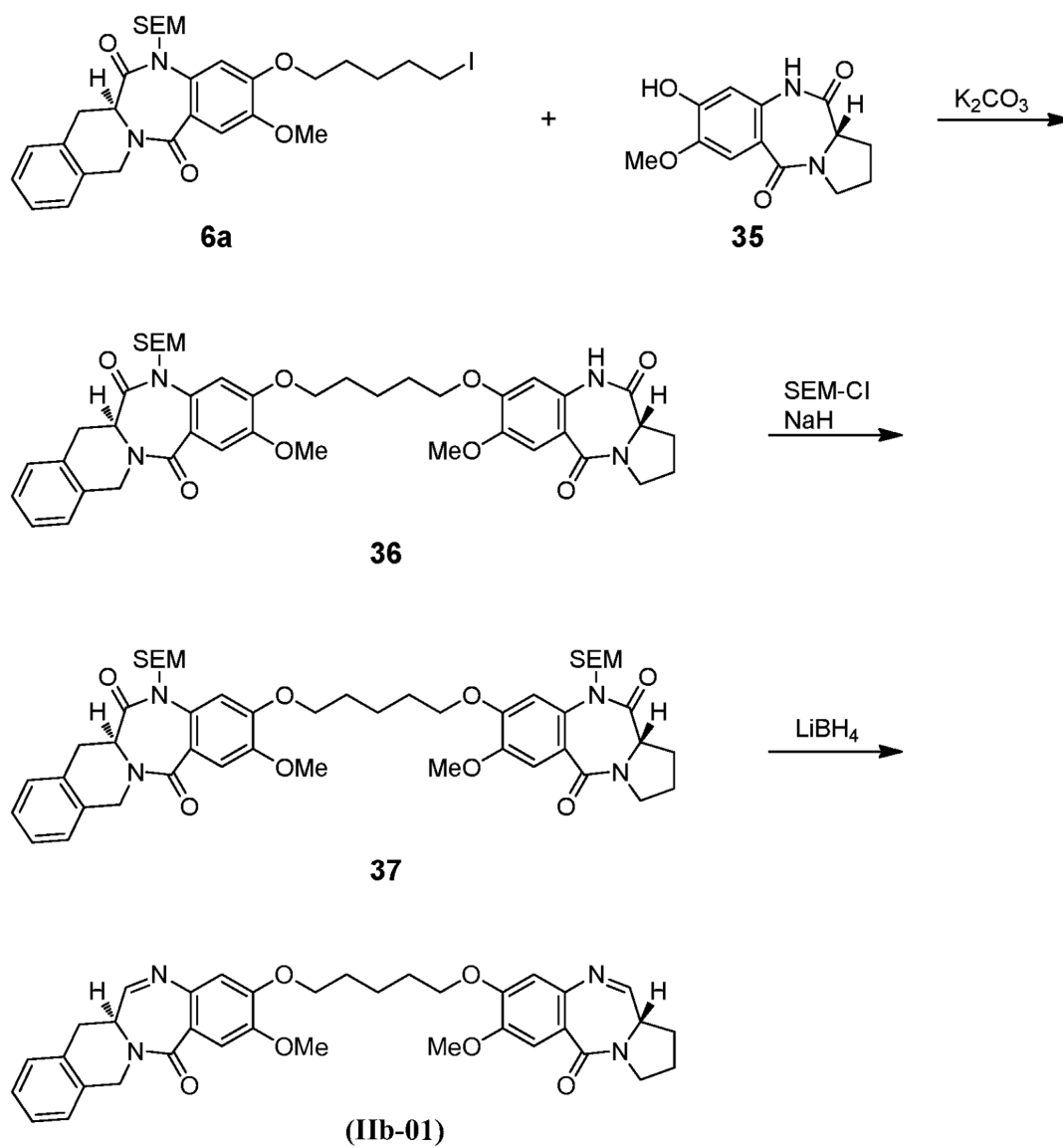
**Fig. 4a**

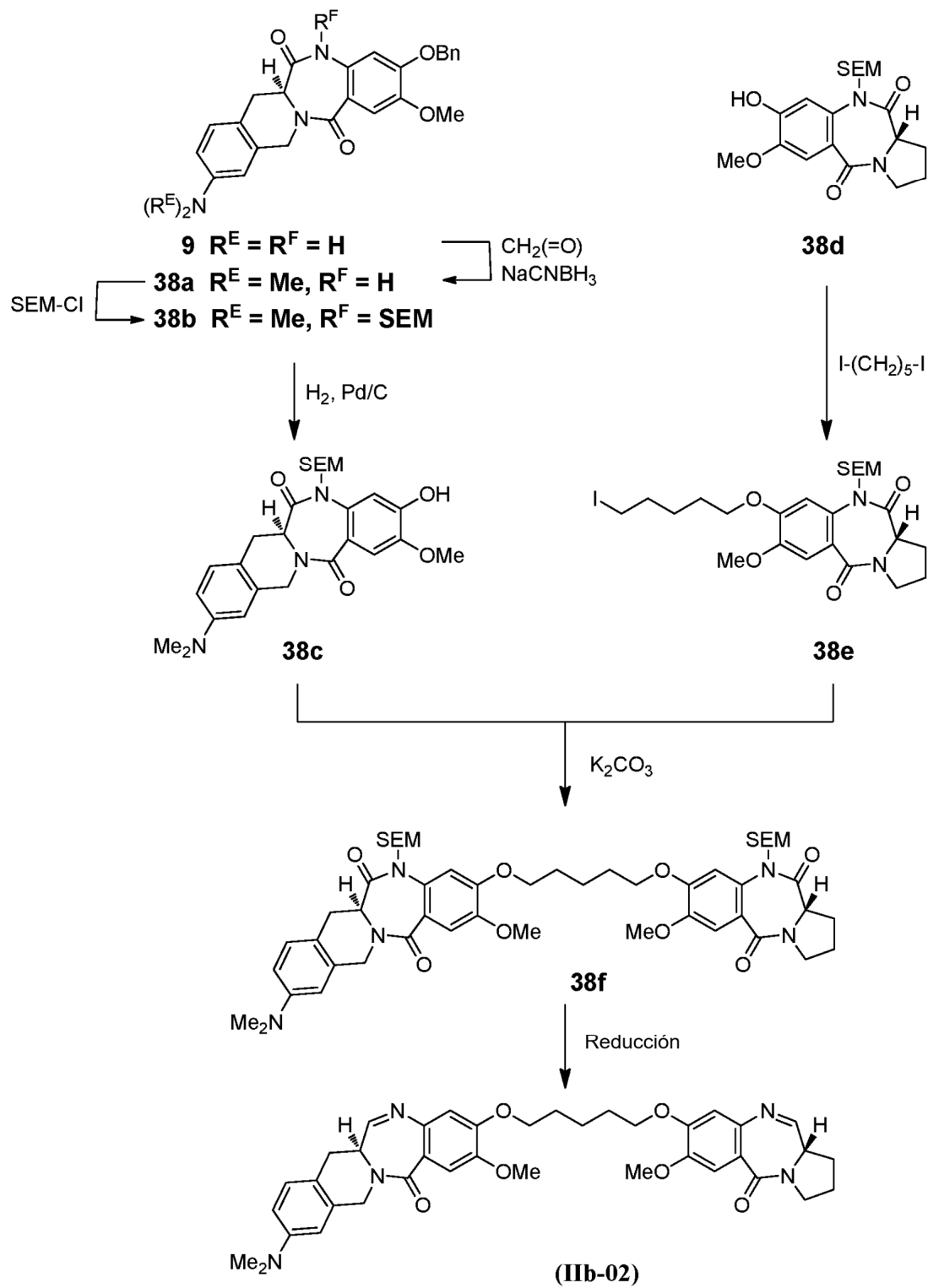
**Fig. 4b**

**Fig. 5**

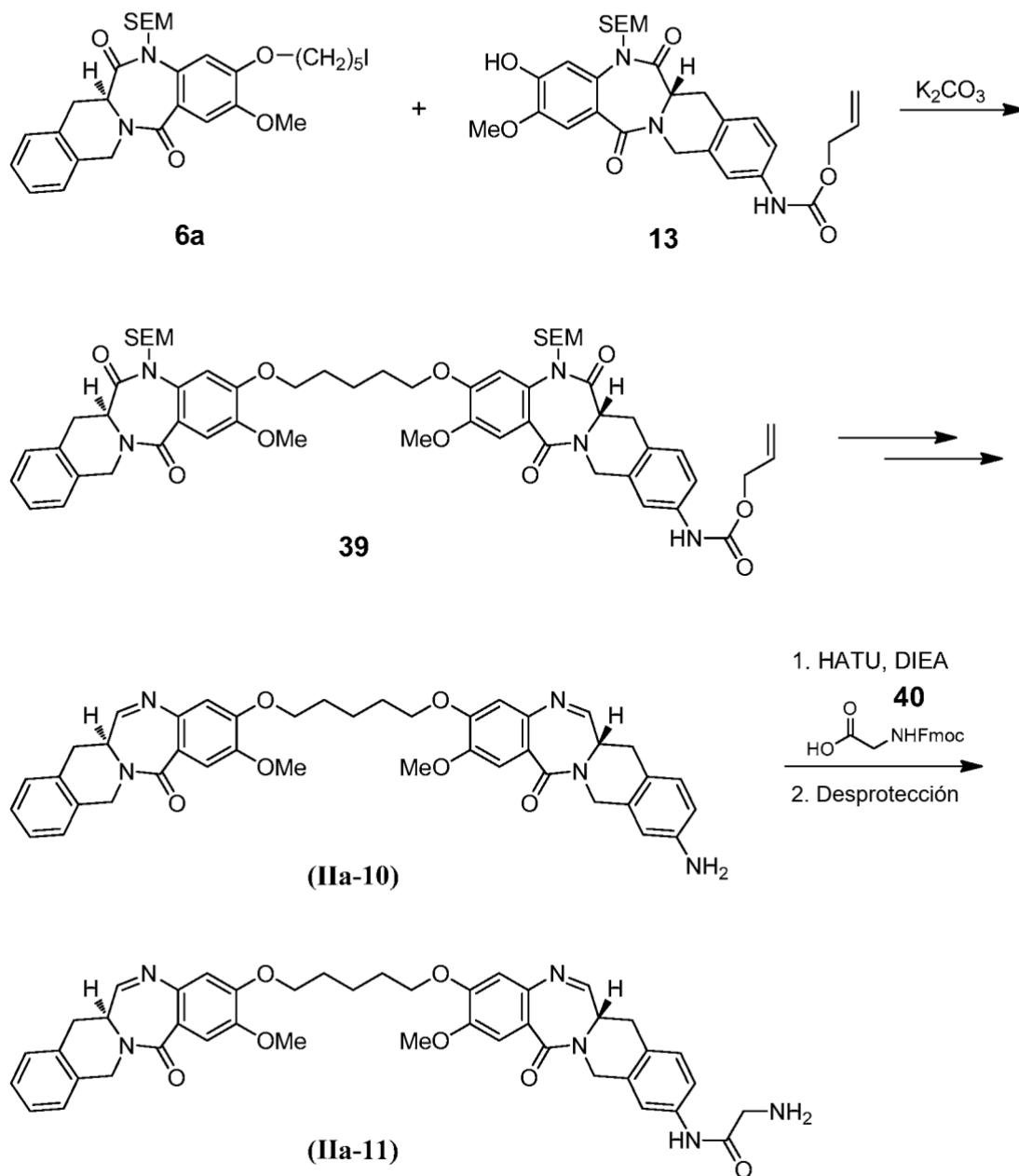
$R^E, R^{E'}$  = diversos grupos

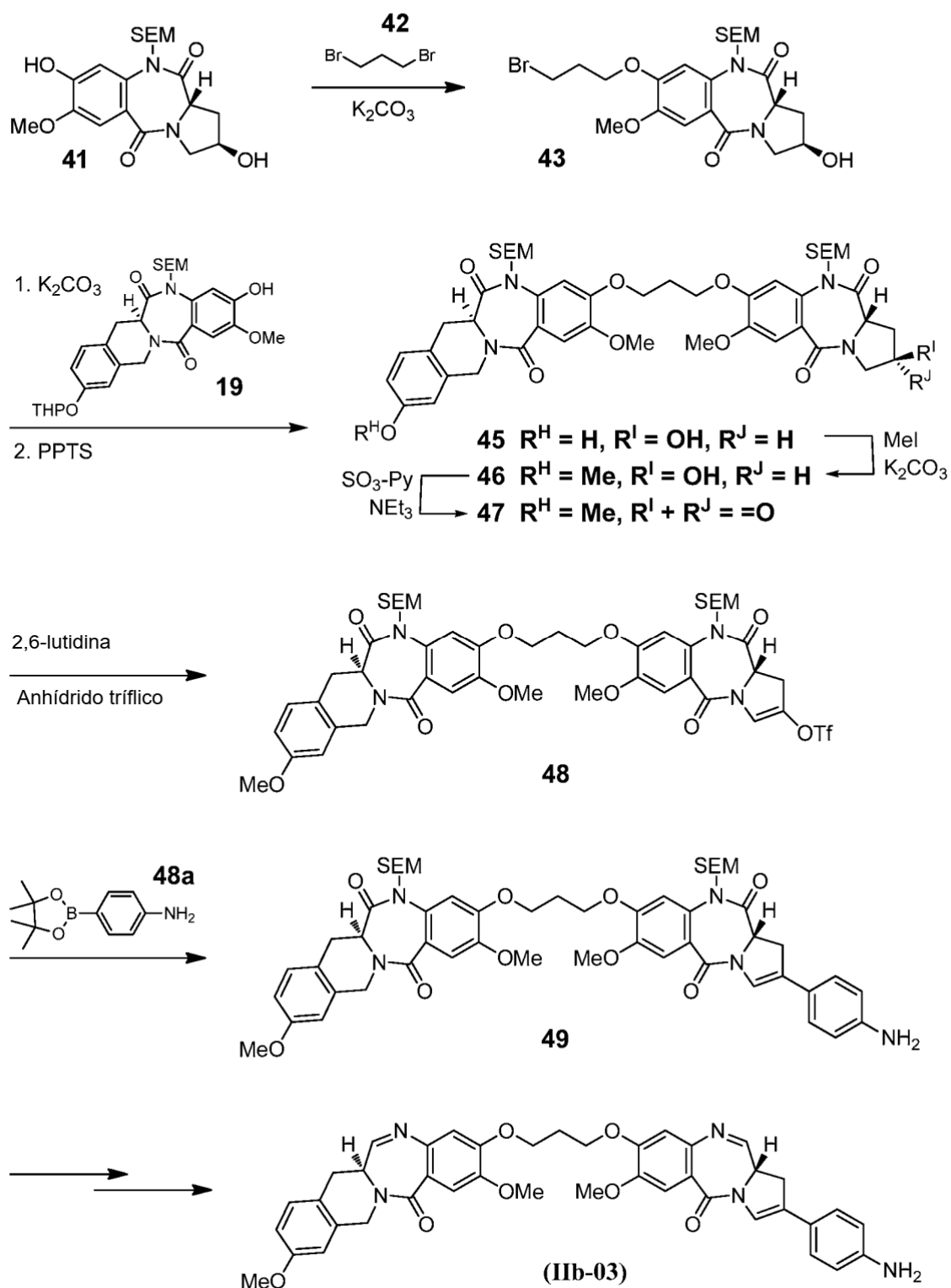
**Fig. 6**

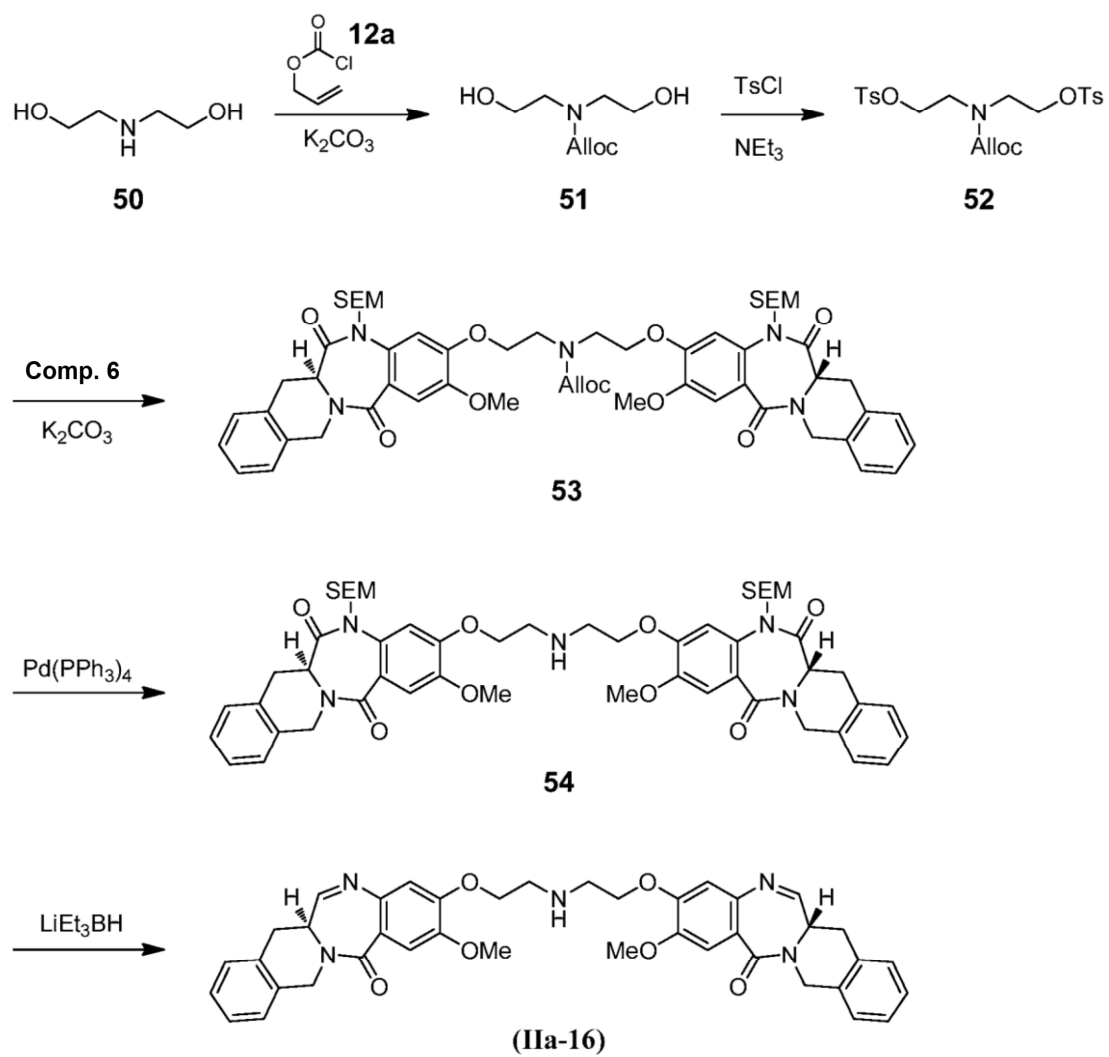
**Fig. 7a**

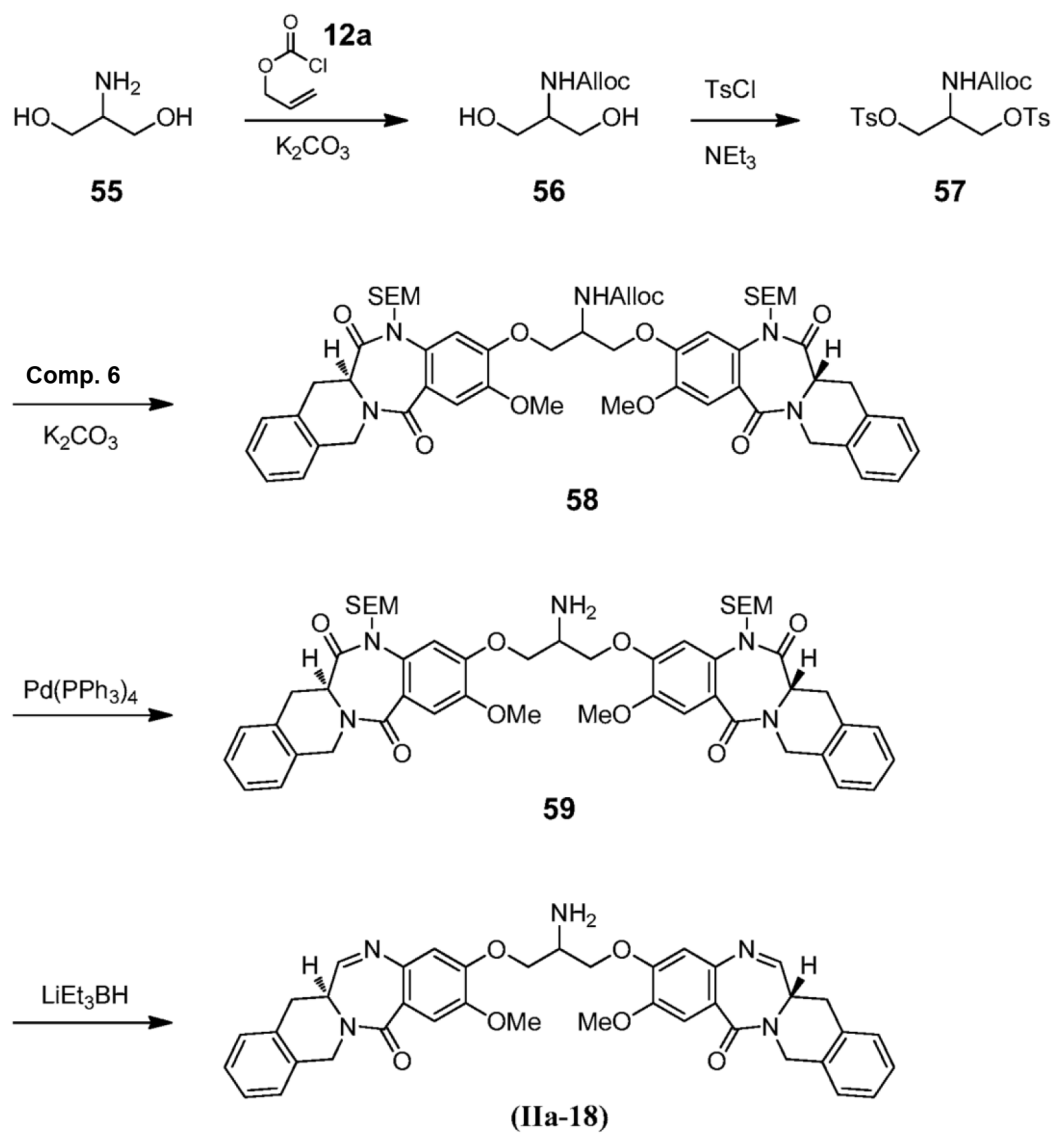
**Fig. 7b**

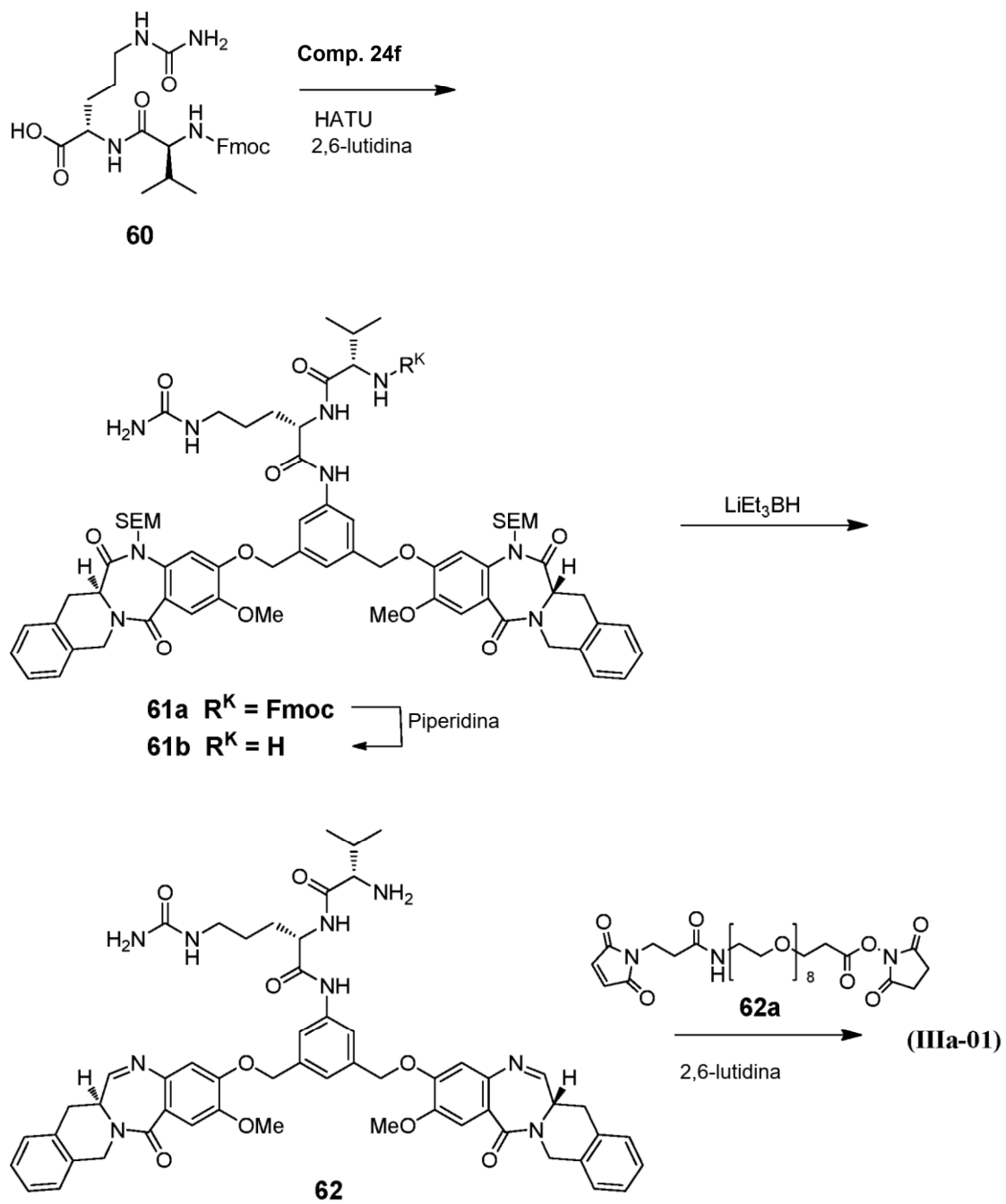


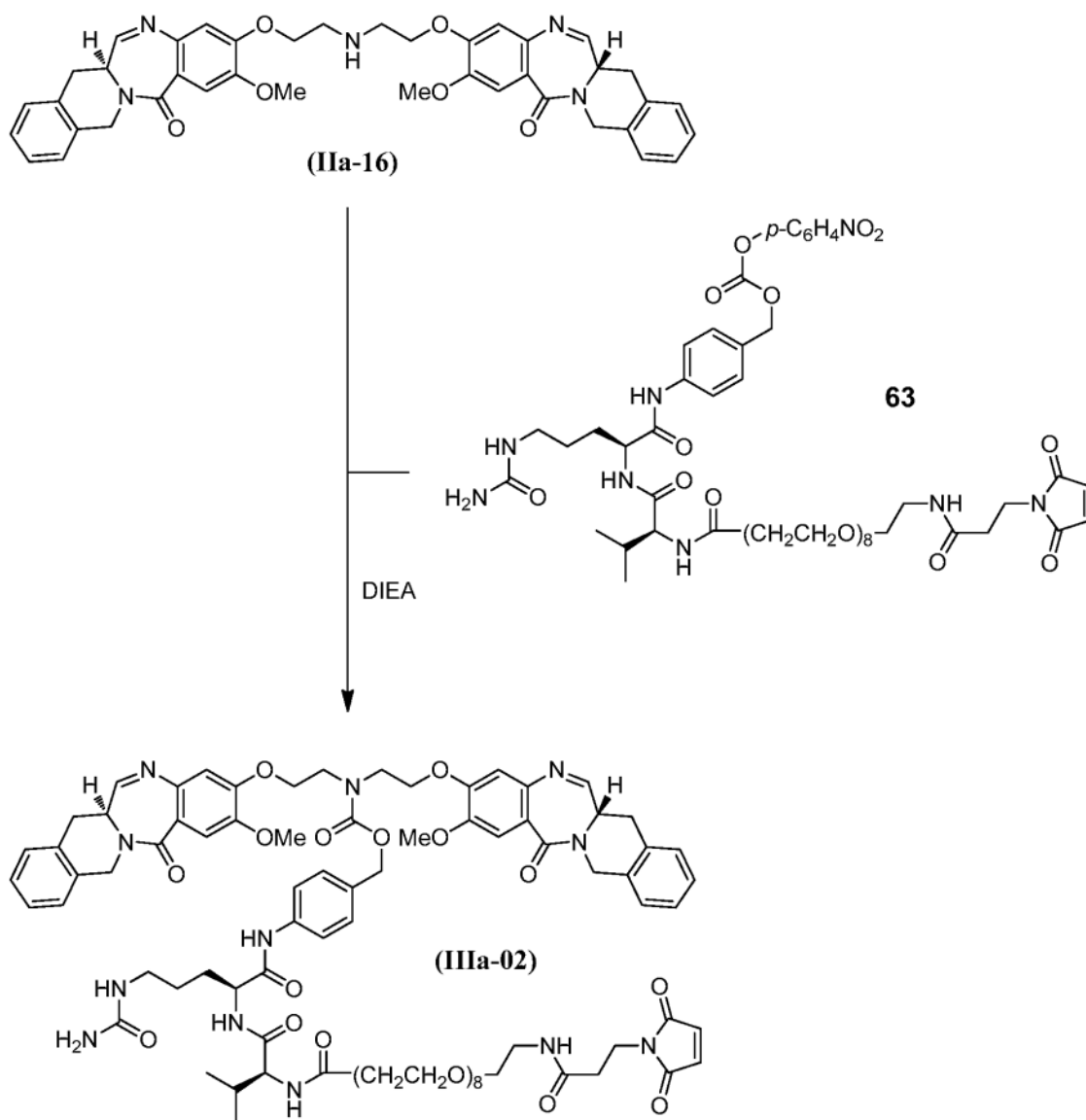
**Fig. 8**

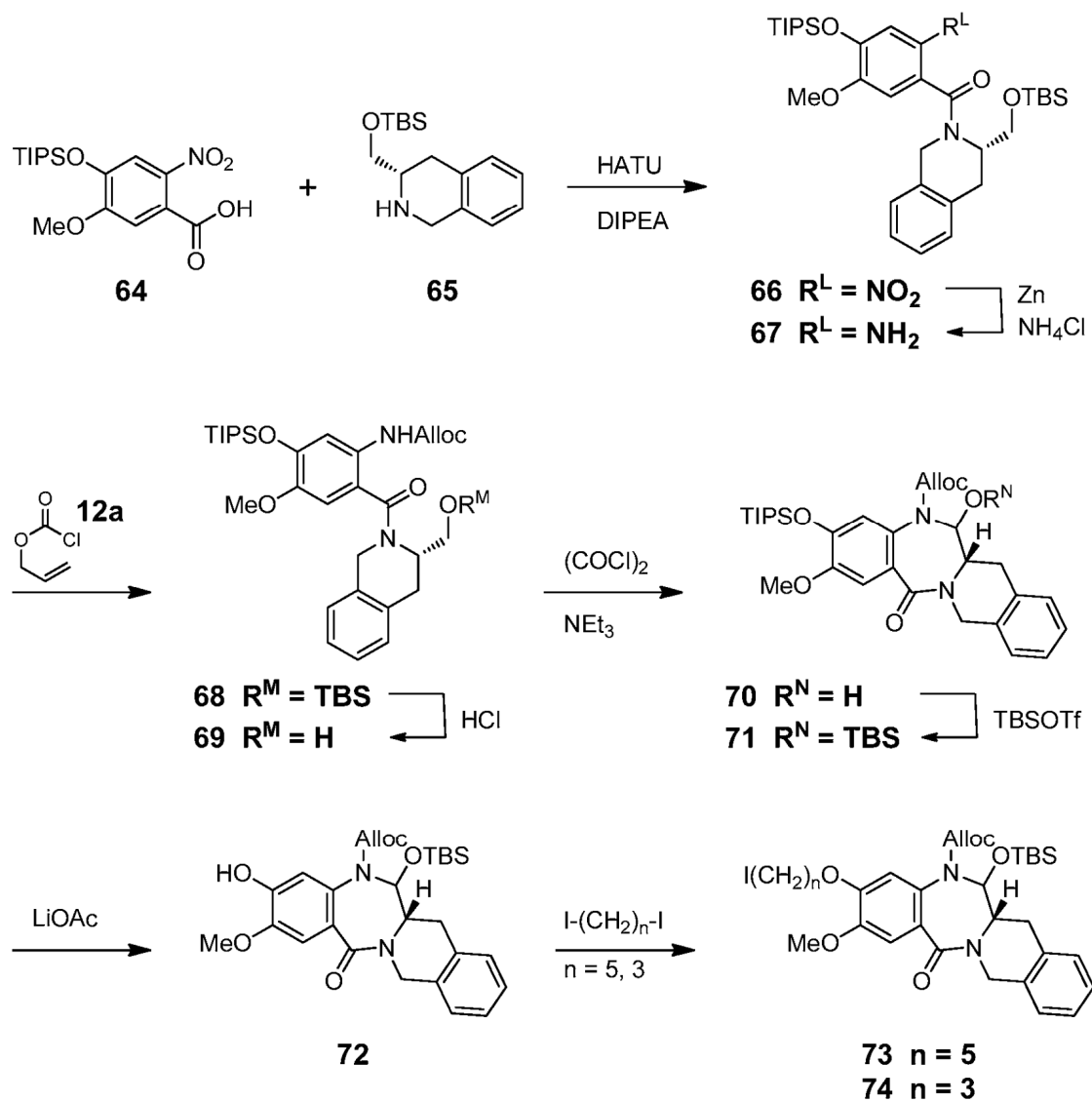
**Fig. 9**

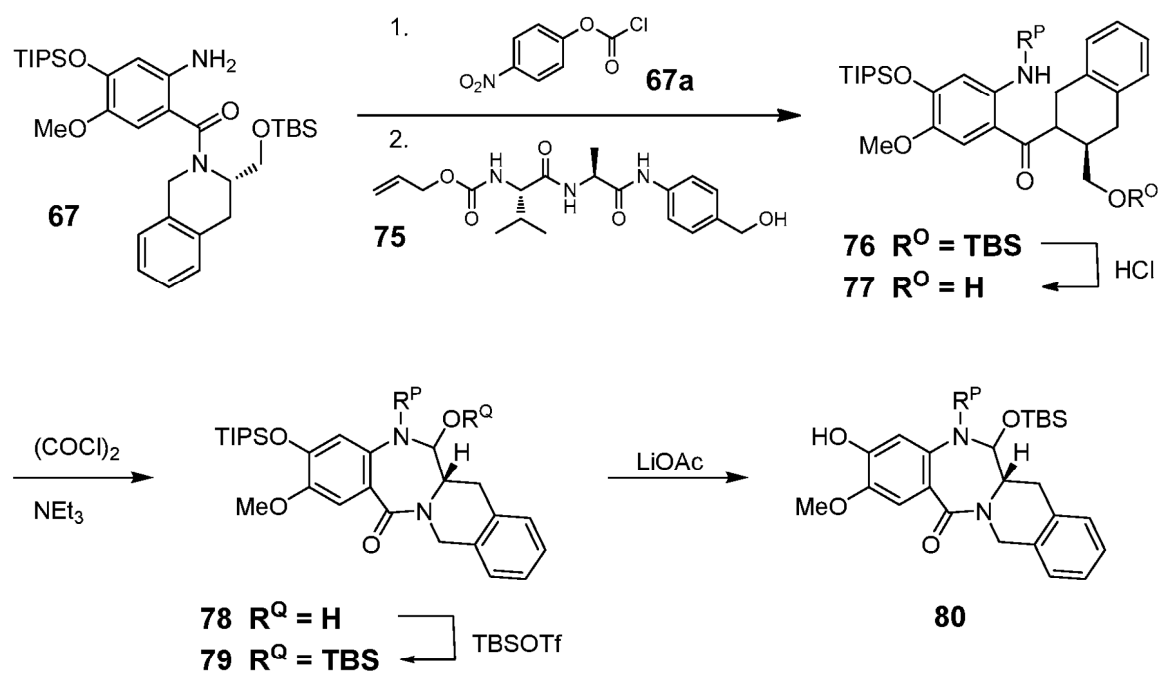
**Fig. 10**

**Fig. 11**

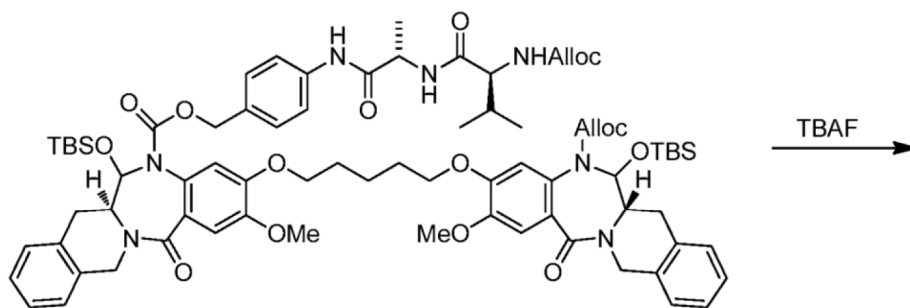
**Fig. 12**

**Fig. 13**

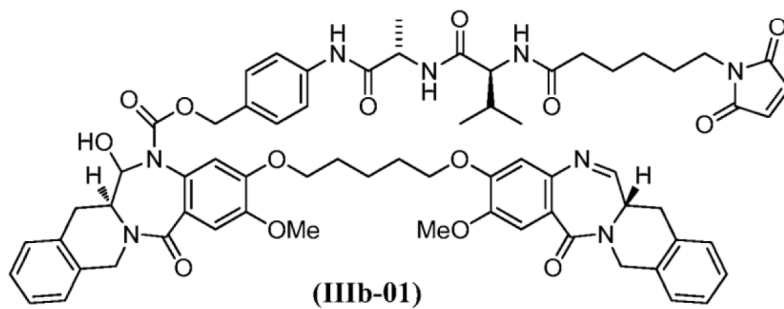
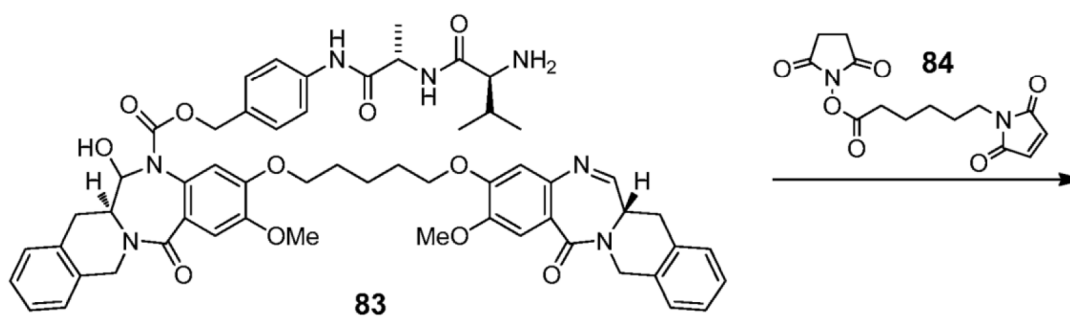
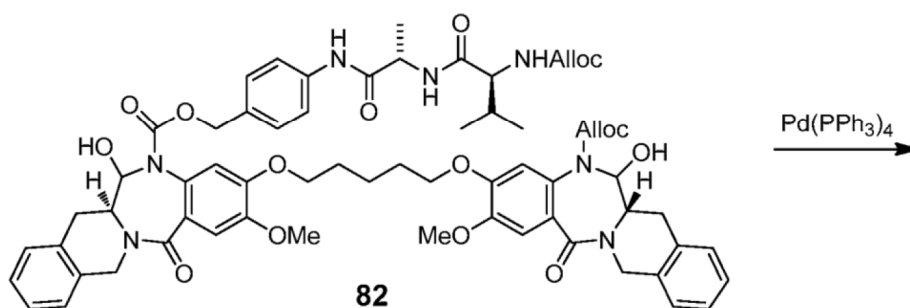
**Fig. 14**

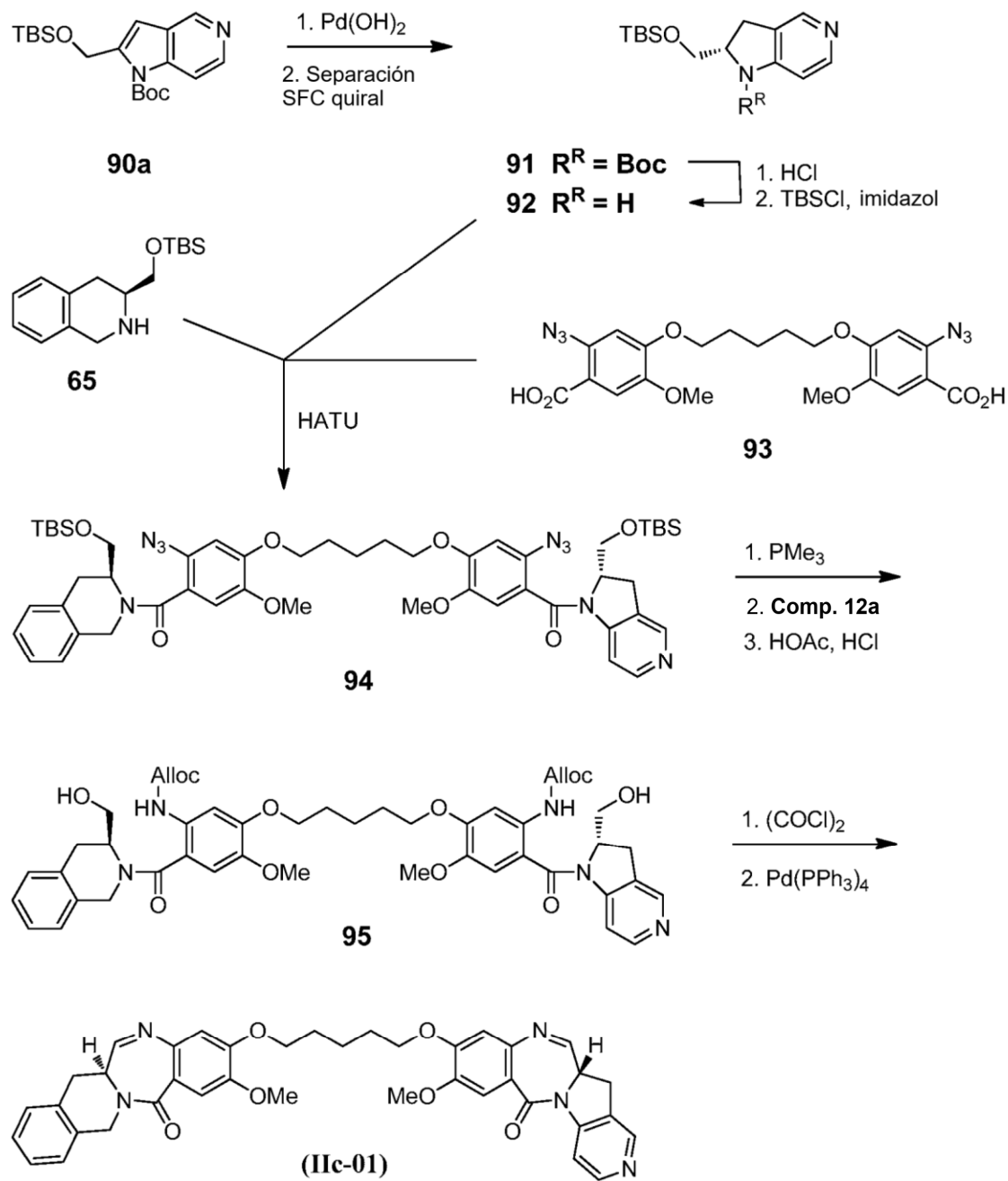
**Fig. 15**

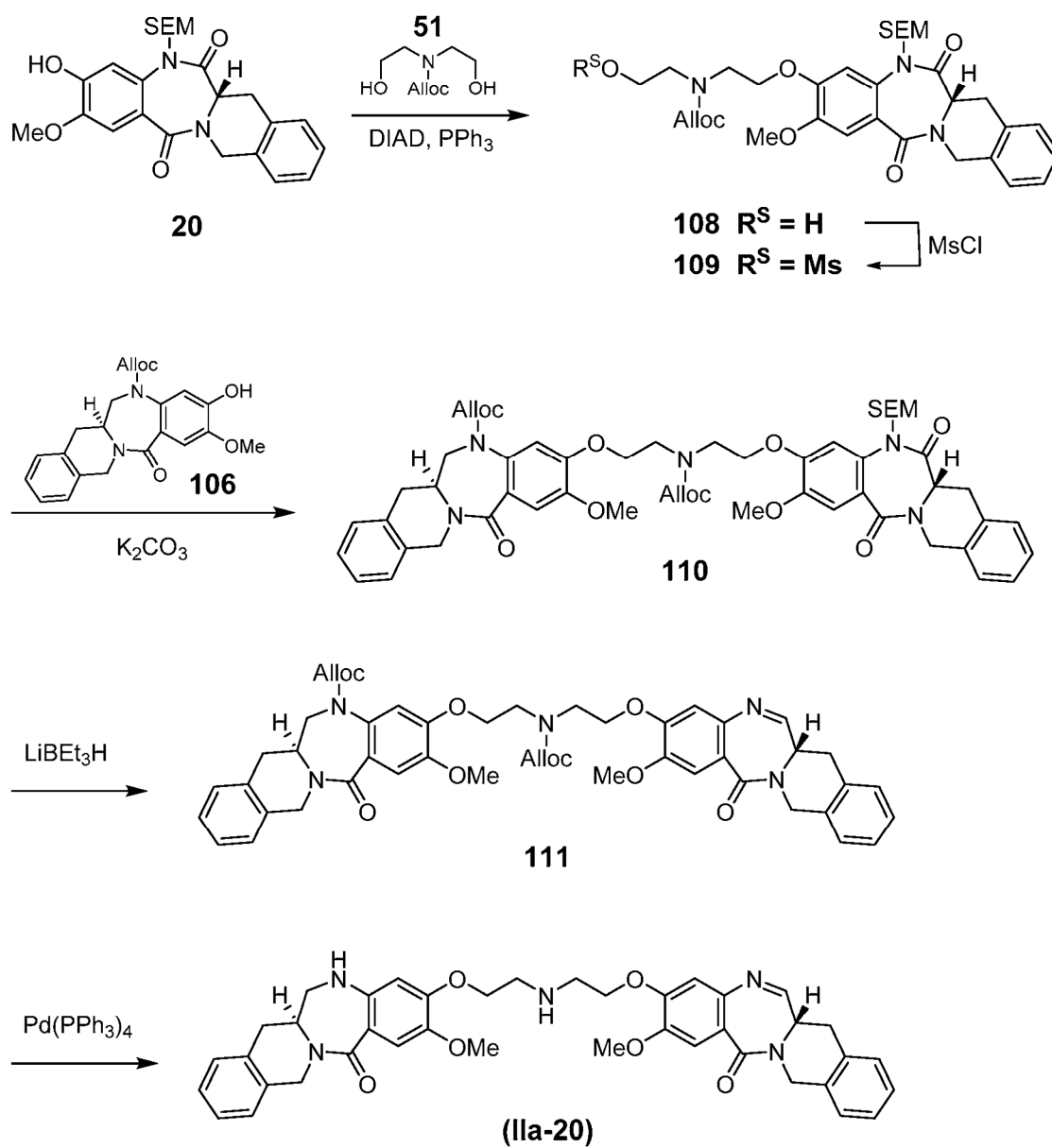


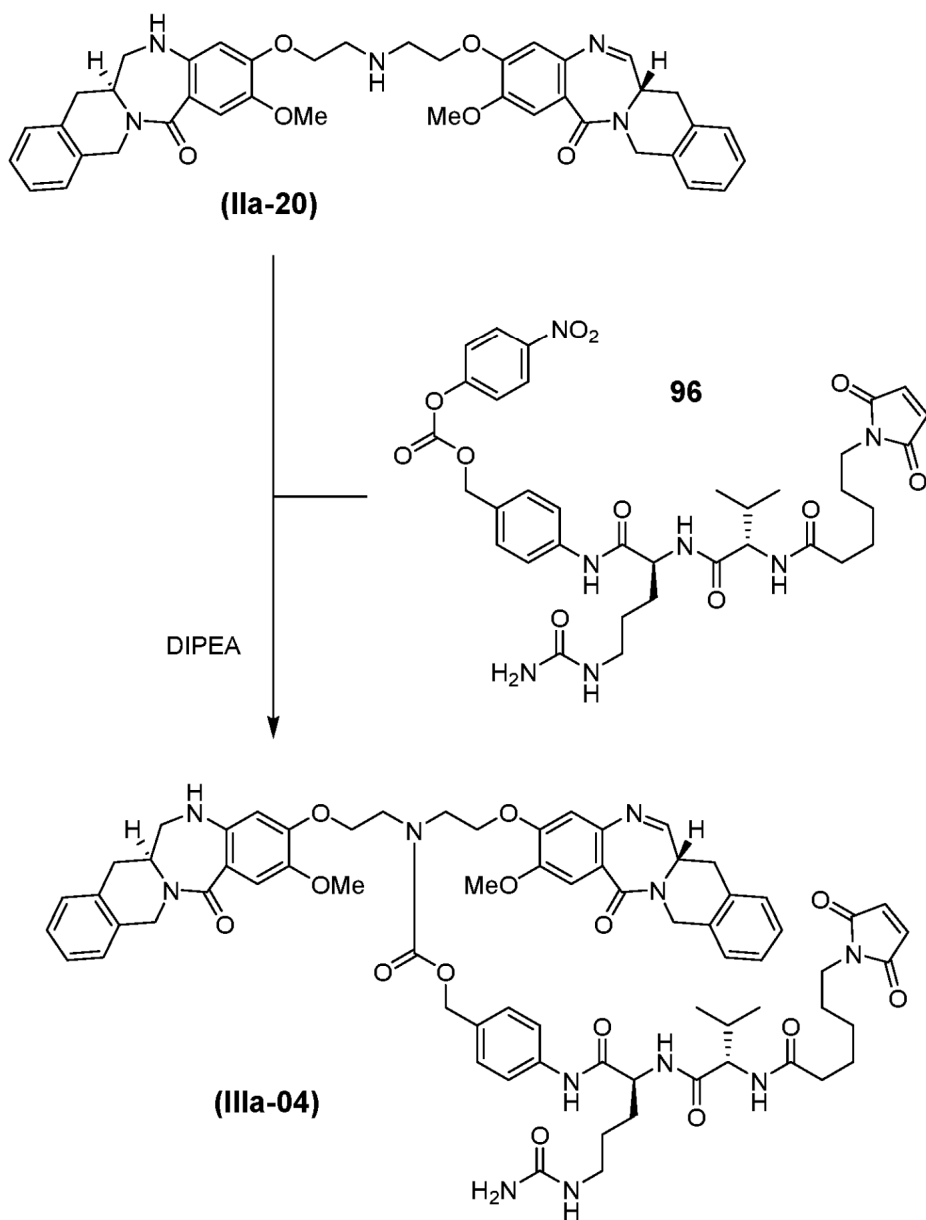
**Fig. 16**

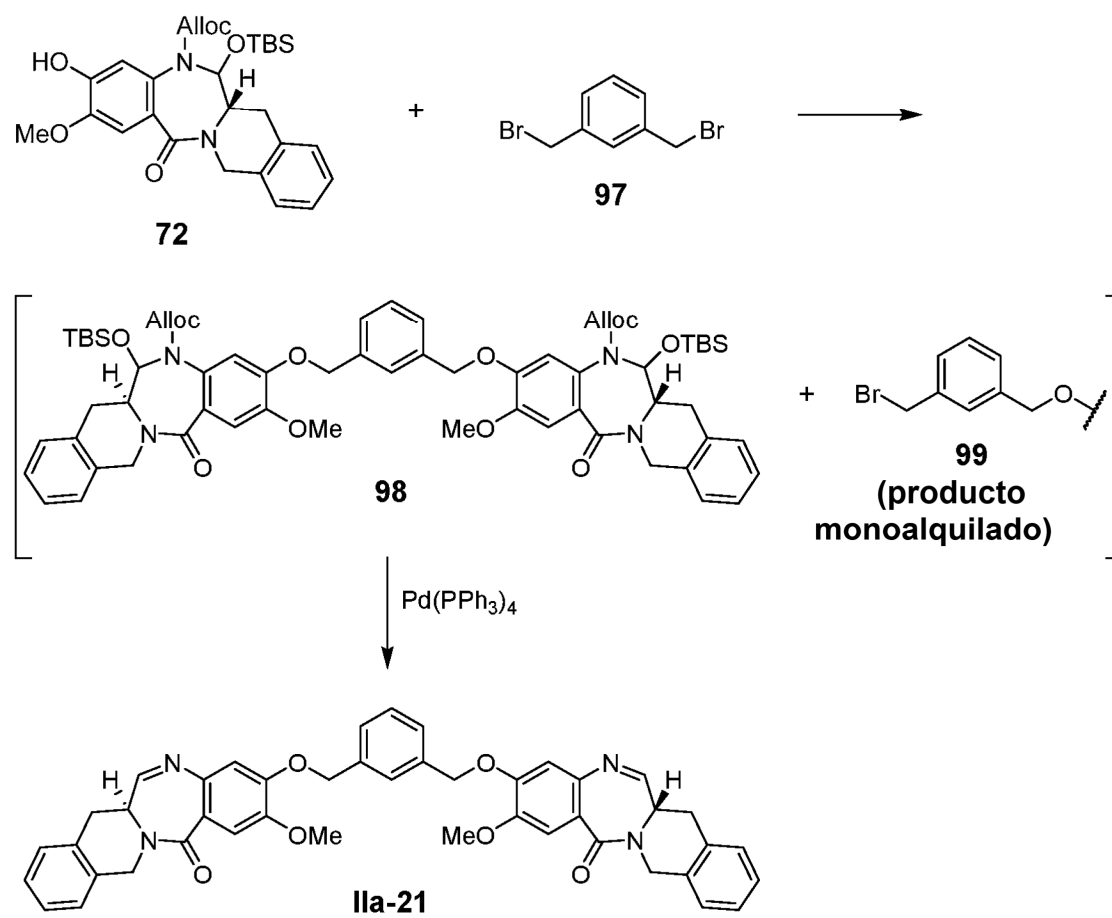
**81** (a partir del Comp. 73 y del Comp. 80)

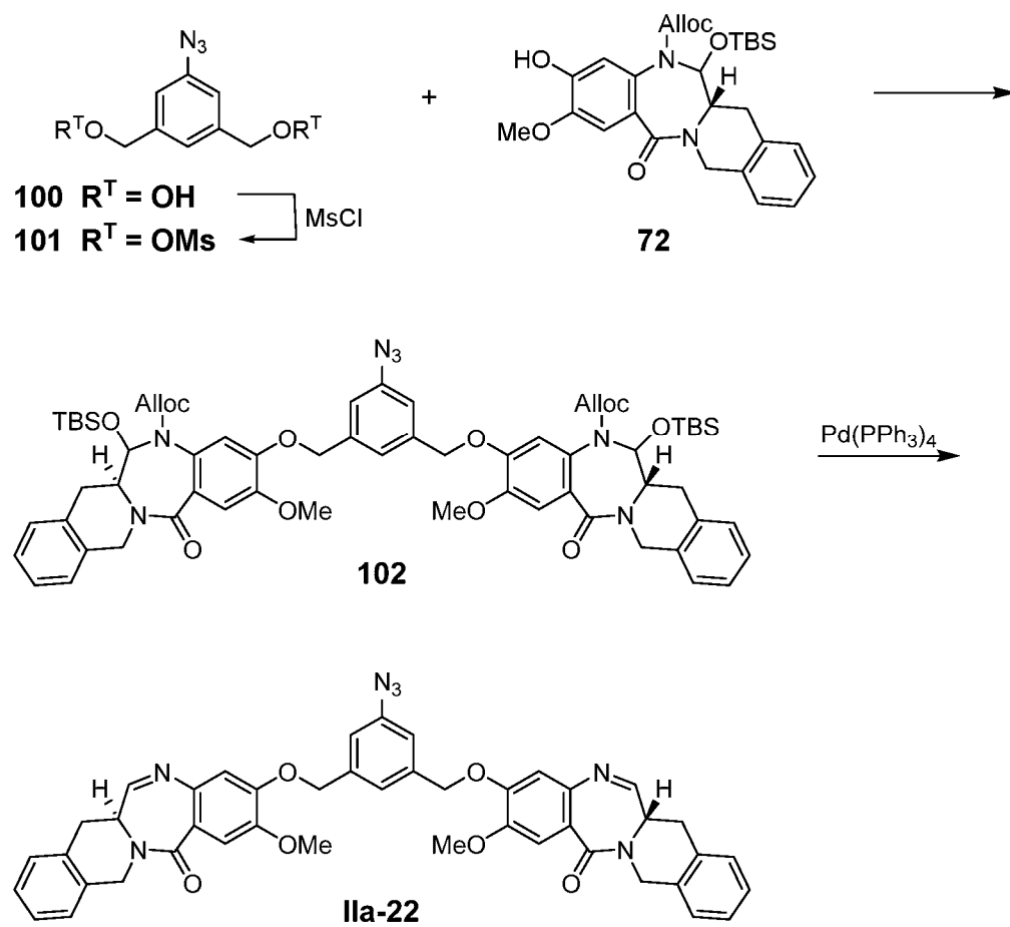


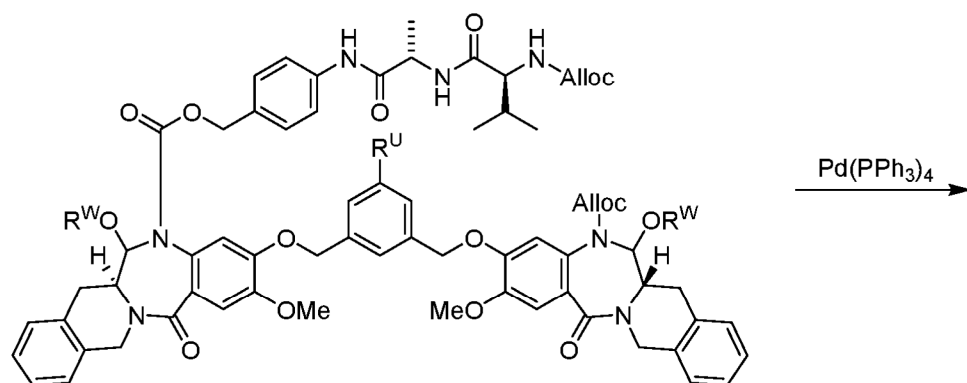
**Fig. 17**

**Fig. 18a**

**Fig. 18b**

**Fig. 19**

**Fig. 20**

**Fig. 21**

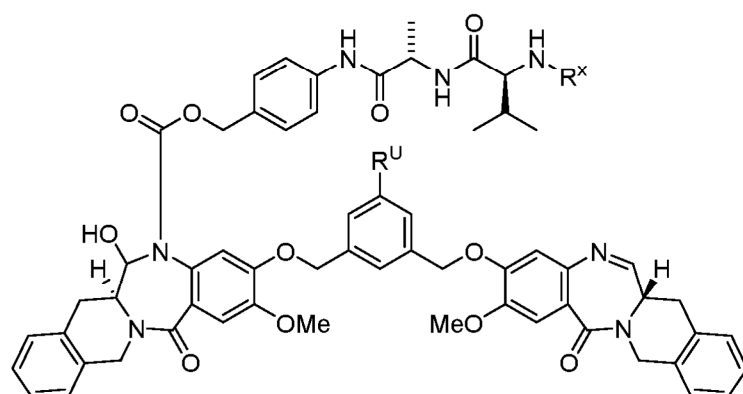
**104a**  $R^U = H$ ,  $R^W = TBS$

**105a**  $R^U = R^W = H$

or

**104b**  $R^U = N_3$ ,  $R^W = TBS$

**105b**  $R^U = N_3$ ,  $R^W = H$

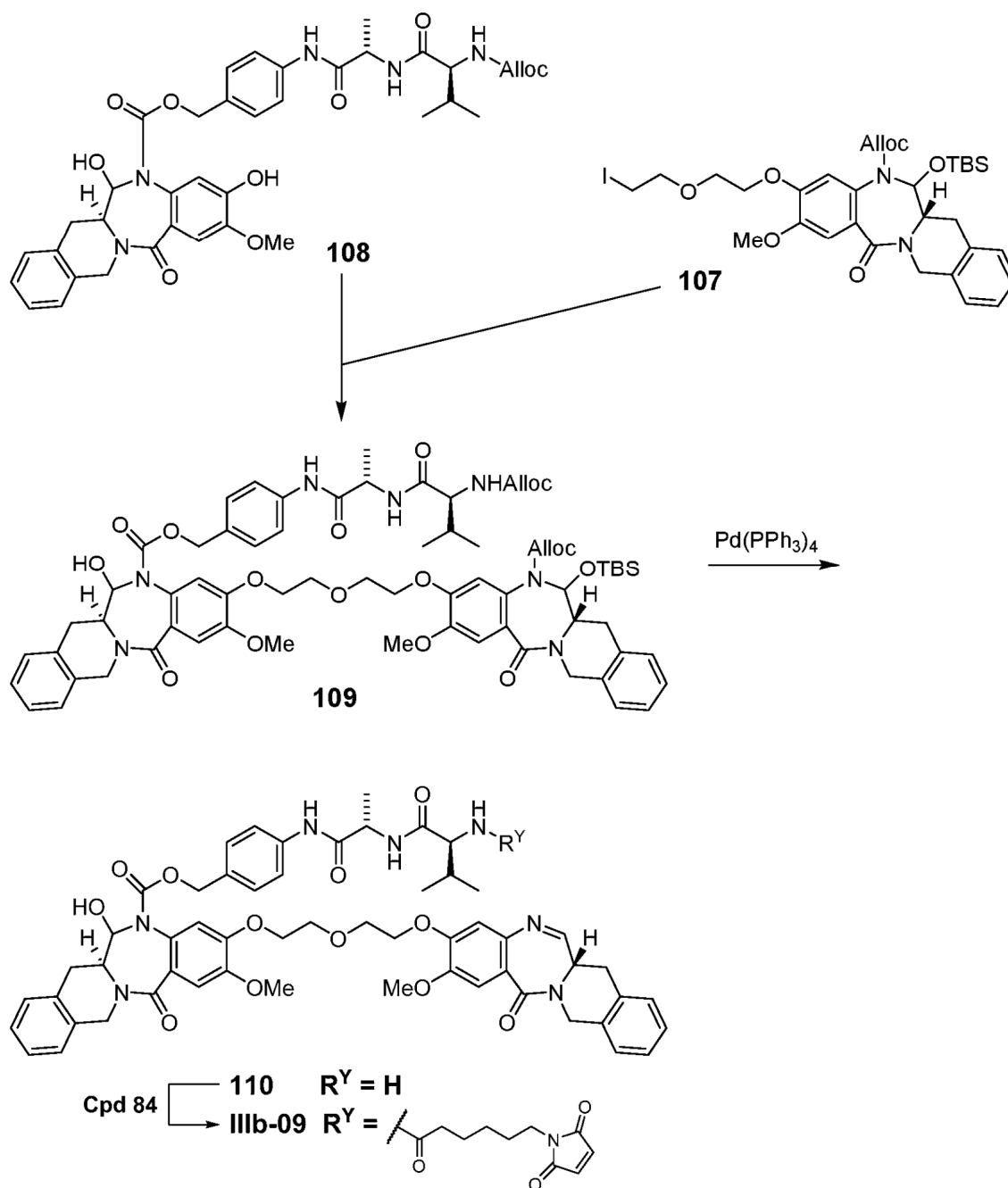


**Cpd 84**  $\rightarrow$  **106a**  $R^U = R^X = H$

**IIIb-07**  $R^U = H$ ,  $R^X =$

**Cpd 84**  $\rightarrow$  **106b**  $R^U = R^X = H$

**IIIb-08**  $R^U = N_3$ ,  $R^X =$

**Fig. 22**



**Fig. 23**