

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 927**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 31/43 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014** **PCT/US2014/071593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15095755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014** **E 14871434 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022** **EP 3082878**

54 Título: **Enlazadores a base de carbamato de metileno para uso con los conjugados focalizados**

30 Prioridad:

19.12.2013 US 201361918539 P

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

04.01.2023

73 Titular/es:

**SEAGEN INC. (100.0%)
21823 30th Drive S.E.
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**KOLAKOWSKI, ROBERT;
JEFFREY, SCOTT y
BURKE, PATRICK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 931 927 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

Enlazadores a base de carbamato de metileno para uso con los conjugados focalizados

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Ha despertado un gran interés el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) para el suministro dirigido de agentes citotóxicos a las células tumorales. Si bien se han evaluado varias clases de fármacos diferentes para la administración a través de anticuerpos, solo unas pocas clases de fármacos han demostrado ser lo suficientemente activas como conjugados de anticuerpo y fármaco, al mismo tiempo que tienen un perfil de toxicidad adecuado, para justificar el desarrollo clínico. Una de esas clases son las auristatinas, relacionadas con el producto natural dolastatina 10. Las auristatinas representativas incluyen MMAE (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-norefedrina) y MMAF (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina).

El diseño de conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC), mediante la unión de un agente citotóxico al anticuerpo, típicamente a través de un enlazador, implica la consideración de una variedad de factores, incluida la presencia de un mango de conjugación en el fármaco para la unión al enlazador y tecnología de enlace para unir el fármaco a un anticuerpo de una manera condicionalmente estable. Ciertas clases de fármacos que se cree que carecen de identificadores de conjugación apropiados se han considerado inadecuados para su uso como ADC. Aunque puede ser posible modificar un fármaco de este tipo para incluir un identificador de conjugación, dicha modificación puede interferir negativamente con el perfil de actividad del fármaco.

Los enlazadores que comprenden ésteres y carbonatos se han usado típicamente para la conjugación de fármacos que contienen alcohol y dan como resultado ADC que tienen perfiles de liberación de fármacos y estabilidad variables. Un perfil no óptimo puede dar como resultado una potencia de ADC reducida, una especificidad inmunológica insuficiente del conjugado y una mayor toxicidad debido a la liberación no específica del fármaco del conjugado. Aunque se ha demostrado que ciertos alcoholes fenólicos se pueden unir directamente a través de enlaces de éter al alcohol p-amidobencílico de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora, es poco probable que estas estrategias de enlace funcionen para todos los fármacos que contienen alcohol, incluidos muchos fármacos que contienen alcohol alifático. Véase, por ejemplo, Toki y col., J. Org. Chem. 2002, 67, 1866-1872). Una de las razones puede deberse al elevado pKa de los fármacos que contienen alcohol alifático.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas tecnologías de enlace que se puedan usar para unir fármacos que hasta ahora se consideraban inadecuados para su uso como ADC y conjugados de fármacos ligandos (LDC) en general, incluida la necesidad de métodos más versátiles para unir alcohol aromático - y fármacos que contienen alcohol alifático a otros ligandos de direccionamiento además de anticuerpos. La presente invención aborda esas y otras necesidades.

El documento US 3927070 describe carbamatos de m-(ureido 3,3-disustituido)fenil[metilo(sustituido)], un proceso para la preparación de dichos carbamatos y un método para controlar especies de plantas indeseables con dichos carbamatos.

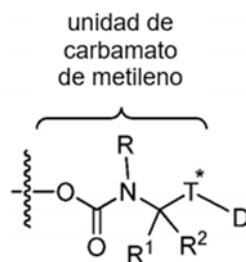
El documento EP 0848957 describe un inhibidor de la solubilización del ligando de Fas útil en el tratamiento de enfermedades provocadas por el ligando de Fas solubilizado, tales como hepatitis, GVHD, SIDA y enfermedades autoinmunes.

45 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

La invención proporciona, entre otros, conjugados de fármaco-ligando, en los que el conjugado de fármaco-ligando está compuesto por una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno para la conjugación de un fármaco con un ligando dirigido, métodos para prepararlos e intermedios de los mismos. Los conjugados de ligando-fármaco de la presente invención son estables en la circulación, pero son capaces de infligir la muerte celular una vez que se libera el fármaco libre de un conjugado en las proximidades o dentro de las células tumorales.

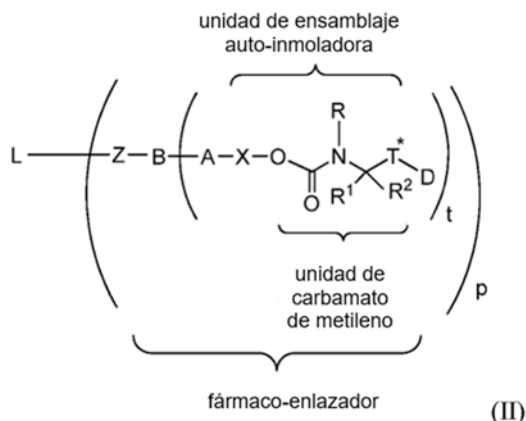
De acuerdo con la presente invención, un conjugado de fármaco y ligando (LDC), o una composición del mismo, se compone de una Unidad de Ligando, una unidad de fármaco y una Unidad Enlazadora que conecta la Unidad de Ligando a la unidad de fármaco, donde la Unidad Enlazadora está compuesta por una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno y un resto auto-inmolador activable, en la que la activación del resto auto-inmolador activable da como resultado la liberación del fármaco libre del LDC a partir de la autoinmolación, y en la que la unidad de carbamato de metileno está unida covalentemente a la Unidad de Fármaco y el resto auto-inmolador activable, en el que la unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a la Unidad de Fármaco está representada por la estructura de Fórmula I:



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R, R¹, R², T* y D son como se definen en la reivindicación 1.

El compuesto conjugado de fármaco de ligando de la presente invención, o una composición del mismo, que tiene la unidad de carbamato de metileno de Fórmula I

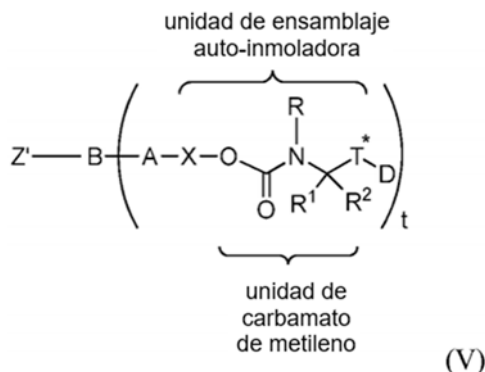


está representado por la estructura de Fórmula II:

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde L, Z, B, A, X, R, R¹, R², T*, D, el subíndice t y el subíndice p son como se definen en la reivindicación 1.

Otras formas de realización principales de la presente invención son compuestos de fármaco-enlazador útiles como intermedios para preparar conjugados de ligando-fármaco, en los que el compuesto enlazador de fármaco está compuesto por una unidad de fármaco y una Unidad Enlazadora, en el que la Unidad Enlazadora consta de un precursor de la unidad extensora (Z') capaz de formar un enlace covalente para un ligando de direccionamiento que proporciona una Unidad de Ligando, una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno y un resto de autoinmolación activable, en el que la activación del resto de autoinmolación activable en un LDC en el que se incorpora el Compuesto de Fármaco-Enlazador da como resultado la liberación de fármaco libre del LDC por autoinmolación, y en el que la unidad de carbamato de metileno está unida covalentemente a la Unidad de Fármaco y al resto auto-inmolador activable.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto enlazador de fármaco que tiene la unidad de carbamato de metileno de Fórmula I tiene la estructura de Fórmula V:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde Z', B, A, X, R, R¹, R², T*, D y el subíndice t son como se define

en la reivindicación 8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 demuestra la estabilidad *ex vivo* en plasma de rata y ratón de una composición de ADC que tiene una carga de fármaco promedio de 4 en la que los ADC de la composición están compuestos por una unidad de carbamato de alcoxi de metileno (unidad MAC) que incorpora el heteroátomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo de auristatina E.

La Figura 2 demuestra la acumulación intracelular de fármaco libre de la administración dirigida por un conjugado de fármaco ligando que tiene una unidad MAC variante unida a una unidad de fármaco de inhibidor PARP BMN-673.

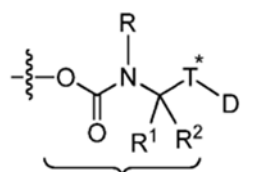
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

General

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la unión de un resto enlazador de fármacos que tiene una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que comprende un resto de autoinmolación activable (X) y una unidad de carbamato de alcoxi de metileno (o ariloxi) (también denominada en el presente documento Unidad MAC) que incorpora el heteroátomo de oxígeno de un grupo funcional hidroxilo de un fármaco (p. ej., un fármaco que tiene un alcohol aromático o alifático) a una Unidad de Ligando que permite la síntesis de ligando condicionalmente estable. Conjugados de fármacos (LDC) a través del grupo funcional hidroxilo del fármaco. Los LDC resultantes pueden liberar fármaco libre al activarse, lo que regenera el grupo funcional hidroxilo.

Una unidad MAC es un tipo de unidad de carbamato de metileno, en el que el heteroátomo del grupo funcional utilizado para la unión covalente de un fármaco que contiene hidroxilo es el átomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del fármaco.

En algunas formas de realización, una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una unidad de fármaco en una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora de un LDC o un compuesto enlazador de fármaco tiene la Fórmula I representada a continuación:

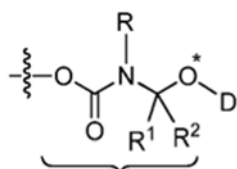


Carbamato de metileno
alcoxi (o ariloxi)

(I),

en la que la línea ondulada indica una unión covalente a un resto auto-inmolador activable (X) de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora; D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado en un resto enlazador de fármaco de una LDC o un Compuesto Enlazador de Fármaco, T* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno; R y R¹ y R² son hidrógeno.

En todos los aspectos, la unidad de carbamato de metileno es una Unidad MAC. En dichas formas de realización, D es una Unidad de fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo y la Unidad MAC unida covalentemente a una Unidad de fármaco en una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora de un LDC o un compuesto de Fármaco-Enlazador tiene la Fórmula I' representada a continuación:



Carbamato de metileno
alcoxi (o ariloxi)

(I'),

en la que la línea ondulada, R, R¹ y R² son como se definen para La Fórmula I, D es una unidad de fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a un resto enlazador de fármacos de una LDC o un compuesto de Fármaco-Enlazador, y O* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno.

La Unidad MAC es el término de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. La función principal de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es liberar fármaco libre (p. ej., H-O*-D) después de un evento de activación selectiva (es decir, condicional) que inicia la autoinmolación del resto de autoinmolación dentro de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. La Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora está diseñada para tener, además de una Unidad MAC, una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y), que es la porción de autoinmolación del resto de autoinmolación activable (X), y una Unidad de Activación (W) sobre el que se actúa condicionalmente para iniciar la secuencia de reacción de autoinmolación dentro de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. La activación de la autoinmolación se produce mediante un evento de escisión que conduce a una rápida fragmentación de Y para liberar el fármaco libre (p. ej., fármaco libre que contiene alcohol). El fármaco incorporado en una LDC de la presente invención puede contener múltiples grupos funcionales, aunque la unión de la Unidad de Fármaco a la Unidad MAC en esos casos es a través de un heteroátomo de solo uno de los grupos funcionales. Por ejemplo, en el caso de fármacos que contienen alcohol, el fármaco puede contener más de un resto de alcohol (es decir, más de un grupo funcional hidroxilo), aunque la unión de la Unidad de Fármaco a la Unidad MAC en esos casos es a través del heteroátomo de oxígeno de uno solo de los grupos funcionales hidroxilo.

15 Definiciones

A menos que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y frases, tal como se usan en el presente documento, tengan los siguientes significados. Cuando se usan nombres comerciales en este documento, el nombre comercial incluye la formulación del producto, el medicamento genérico y los ingredientes farmacéuticos activos del producto del nombre comercial, a menos que el contexto indique lo contrario.

El término "anticuerpo" como se usa aquí se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada. La forma nativa de un anticuerpo es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada (VL y VH) son juntas las principales responsables de la unión a un antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y pesada constan de una región marco interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones constantes pueden ser reconocidas e interactuar con el sistema inmunitario. (ver, por ejemplo, Janeway et al., 2001, Immunol. Biology, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. El anticuerpo se puede derivar de cualquier especie adecuada. En algunas formas de realización, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos en secuencia excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural que pueden estar presentes en menores montos. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un solo sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular.

Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2, CH3 y CH4, según corresponda para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p. ej., dominios constantes de secuencia nativa humanos) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos (s), un fragmento(s) producido(s) por una biblioteca de expresión Fab, o fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno viral o un antígeno microbiano).

Un "antígeno" es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo.

Los términos "unión específica" y "se une específicamente" significan que el anticuerpo o derivado de anticuerpo se unirá, de una manera altamente selectiva, con su epítopo correspondiente de un antígeno diana y no con la multitud de otros antígenos. Normalmente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, y preferiblemente de 10^{-8} M a 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) que no sea el antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término "inhibir" o "inhibición de" significa reducir en una cantidad medible o prevenir por completo.

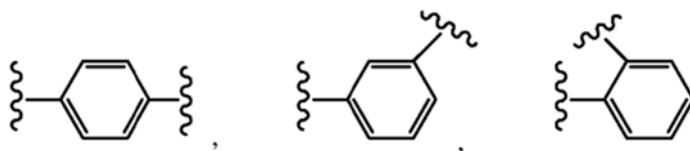
- El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un conjugado eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, retardar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda inhibir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).
- El término "sustancial" o "sustancialmente" se refiere a una mayoría, es decir, >50 % de una población, de una mezcla o una muestra, preferiblemente más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de una población.
- El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto destructor de células de un fármaco o conjugado de fármaco-ligando o un metabolito intracelular de un conjugado de fármaco-ligando. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor CI_{50} , que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que sobrevive la mitad de las células.
- El término "actividad citostática" se refiere a un efecto antiproliferativo de un fármaco o conjugado de fármaco-ligando o un metabolito intracelular de un conjugado de fármaco-ligando.
- El término "agente citotóxico", Como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que tiene actividad citotóxica y provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los análogos sintéticos y derivados de los mismos.
- El término "agente citostático", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe una función de las células, incluido el crecimiento o la multiplicación celular. Los agentes citostáticos incluyen inhibidores tales como inhibidores de proteínas, por ejemplo, inhibidores de enzimas. Los agentes citostáticos tienen actividad citostática.
- Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición o trastorno fisiológico en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.
- Una "enfermedad autoinmune" Como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad o trastorno que surge de y está dirigido contra los propios tejidos o proteínas de un individuo.
- "Paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto al que se le administra un conjugado de ligando-fármaco de la presente invención. El paciente incluye, entre otros, humanos, ratas, ratones, conejillos de indias, primates no humanos, cerdos, cabras, vacas, caballos, perros, gatos, pájaros y aves. Típicamente, el paciente es una rata, un ratón, un perro, un primate humano o no humano, más típicamente un ser humano.
- Los términos "tratar" o "tratamiento", a menos que el contexto indique lo contrario, se refieren a tratamientos terapéuticos y profilácticos en los que el objetivo es inhibir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como el desarrollo o la propagación de cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o la desaceleración de la progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o el trastorno.
- En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: matar células tumorales; inhibir el crecimiento de células tumorales, células cancerosas o de un tumor; inhibiendo la replicación de células tumorales o células cancerosas, disminuyendo la carga global del tumor o disminuyendo el número de células cancerosas y mejorando uno o más síntomas asociados con la enfermedad.
- En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "tratar" incluye cualquiera o todos los siguientes: inhibir la replicación de células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune que incluye, entre otras, células que producen un anticuerpo autoinmune, disminuir el autoinmune- carga de anticuerpos y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.
- La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto (p. ej., un fármaco, un enlazador de fármaco o un conjugado de ligando-fármaco). En algunos aspectos, el compuesto puede contener al menos un grupo amino y, en consecuencia, se pueden formar sales de adición de ácido con el grupo amino. Las sales ejemplares incluyen, pero no se limitan a sulfato, trifluoroacetato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido,

- isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga del compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.
- Una Unidad Enlazadora es un resto bifuncional que conecta una unidad de fármaco a una Unidad de Ligando en un conjugado de ligando y fármaco. Las Unidades Enlazadoras de la presente invención tienen varios componentes (p. ej., una Unidad Estiradora que tiene una Unidad Básica opcional, una Unidad de Ramificación opcional, una Unidad Conectora opcional y una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora).
- "Unidad básica", como se usa en el presente documento, es un resto orgánico de una Unidad Estiradora (Z) o un precursor de la Unidad Estiradora (Z'), compuesto por un sistema de succinimida o maleimida, respectivamente. Cuando forma parte de una Unidad Estiradora, una Unidad Básica es capaz de catalizar la adición de una molécula de agua a uno de los enlaces succinimida carbonil-nitrógeno de Z y puede iniciarse en condiciones controladas tolerables por la Unidad de Ligando, que está unida a esa Unidad Estiradora. Para ello, el grupo funcional básico de la Unidad Básica (UB) y su posición relativa en Z con respecto a su sistema de anillos succinimida se selecciona por su capacidad de formar puentes de hidrógeno con un grupo carbonilo de ese sistema de anillos para aumentar efectivamente su electrofilicidad y de ahí su susceptibilidad al ataque del agua. Alternativamente, esas variables se seleccionan de modo que una molécula de agua, cuya nucleofilicidad aumenta por la unión de hidrógeno al grupo funcional básico de UB, se dirija a un grupo carbonilo del sistema de anillo de succinimida de Z. Típicamente, tal Unidad Básica, actuando a través de cualquiera de los dos mecanismos está compuesto por 1-6 átomos de carbono contiguos que conectan su grupo funcional amino básico con el resto de la Unidad Estiradora. Para aumentar la electrofilicidad de un carbonilo de succinimida en Z mediante enlaces de hidrógeno, se requiere que UB tenga un grupo funcional de amina primaria o secundaria, mientras que el aumento de la nucleofilicidad del agua de la manera descrita se puede hacer con una amina primaria, secundaria o terciaria como grupo funcional básico de UB. Para que el grupo funcional básico de amina esté en la proximidad requerida para ayudar en la hidrólisis de la succinimida de Z por cualquier mecanismo, la cadena de carbono de UB que contiene amina se une típicamente a un carbono alfa de un resto alquilo opcionalmente sustituido que es deshuesada al nitrógeno de maleimida del correspondiente precursor de la Unidad Estiradora Z'.
- Cuando forma parte de un precursor de la Unidad de estirado, un grupo funcional de amina básica de una Unidad básica se protege típicamente como una forma de sal o con un grupo protector adecuado para evitar la hidrólisis prematura del resto de maleimida o el ataque directo por el átomo de nitrógeno nucleofílico del grupo funcional básico de amina en un átomo de carbono carbonilo del sistema de anillos de restos de maleimida. Un grupo protector adecuado para ese propósito es un grupo protector lábil en medio ácido tal como un grupo alquilo carbonilo. Ejemplos ejemplares, pero no limitativos, de Unidades Básicas son $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^{op}$, o $-(CH_2)_xN(R^{op})_2$, donde x es un número entero que va desde 1-4 y R^{op} en estos ejemplos es alquilo C₁₋₆.
- "Unidad PEG", tal como se usa en el presente documento, es un resto orgánico compuesto por subunidades etilenoxi repetidas y puede ser polidisperso, monodisperso o discreto (es decir, que tiene un número discreto de subunidades etilenoxi). Los PEG polidispersos son una mezcla heterogénea de tamaños y pesos moleculares, mientras que los PEG monodispersos normalmente se purifican a partir de mezclas heterogéneas y, por lo tanto, proporcionan una longitud de cadena y un peso molecular únicos. Las Unidades de PEG preferidas son PEG discretos, compuestos que se sintetizan paso a paso y no a través de un proceso de polimerización. Los PEG discretos proporcionan una sola molécula con una longitud de cadena definida y especificada.
- La unidad de PEG proporcionada en el presente documento comprende una o varias cadenas de polietilenglicol, cada una de las cuales comprende una o más subunidades de etilenoxi, unidas covalentemente entre sí. Las cadenas de polietilenglicol se pueden unir entre sí, por ejemplo, en una configuración lineal, ramificada o en forma de estrella. Una unidad de PEG preferida tiene una sola cadena de polietilenglicol con 8 a 24 subunidades $-CH_2CH_2O-$ unidas covalentemente en serie y terminadas en un extremo con una unidad de protección de PEG.
- A menos que se indique lo contrario, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro término se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado de cadena lineal o ramificado sustituido o no sustituido que tiene el número indicado de átomos de carbono (p. ej., "-alquilo C₁-C₈" o "-alquilo C₁-C₁₀" se refieren a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 o de 1 a 10 átomos de carbono, respectivamente). Cuando no se indica el número de átomos de carbono, el grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "-alquilo C₁-C₈" de cadena lineal representativos incluyen, entre otros, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo y -n-octilo; mientras que los -alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero no se limitan a -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -*tert*-butilo, -isopentilo y -2-metilbutilo; los -alquilos C₂-C₈ insaturados incluyen, entre otros, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexilo, -2-hexilo, -3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1-butenilo. A veces, un grupo alquilo no está sustituido. Un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más grupos. En otros aspectos, un grupo alquilo estará saturado.

A menos que se indique lo contrario, "alquileo", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada saturado sustituido o no sustituido del número indicado de átomos de carbono, típicamente 1-10 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano original. Los radicales alquileo típicos incluyen, entre otros: metileno ($-\text{CH}_2-$), 1,2-etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-propilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-butilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), y similares. En aspectos preferidos, un alquileo es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada (es decir, no es un hidrocarburo cíclico).

A menos que se indique lo contrario, "arilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un radical de hidrocarburo aromático carbocíclico monovalente sustituido o no sustituido del número indicado de átomos de carbono, típicamente 6-20 átomos de carbono, derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático original. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un grupo arilo ejemplar es un grupo fenilo.

A menos que se indique lo contrario, un "arileno", por sí mismo o como parte de otro término, es un grupo arilo como se define anteriormente que tiene dos enlaces covalentes (es decir, es divalente) y puede estar en orto, meta u orientaciones para como se muestra en las siguientes estructuras, con fenilo como grupo ejemplar:



A menos que se indique lo contrario, un "heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ ", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un aromático monovalente sustituido o no sustituido o sistema de anillo monocíclico o bicíclico no aromático que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (también denominados miembros del anillo) y de uno a cuatro miembros del anillo de heteroátomos seleccionados independientemente de N, O, P o S, y derivados de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo anular de un sistema anular padre. Se pueden oxidar uno o más átomos de N, C o S en el heterociclo. El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. Los heterociclos en los que todos o los átomos del anillo están involucrados en la aromaticidad se denominan heteroarilos y, de lo contrario, se denominan heterocarbociclos. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo está unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Como tal heteroarilo puede estar enlazado a través de un carbono aromático de su sistema de anillo aromático, denominado heteroarilo unido a C, o a través de un átomo de N sin doble enlace (es decir, no $=\text{N}-$) en su sistema de anillo aromático, que se denomina heteroarilo unido a N. Por lo tanto, los heterociclos que contienen nitrógeno pueden estar unidos por C o por N e incluir restos de pirrol, como pirrol-1-ilo (unido a N) y pirrol-3-ilo (unido a C), y restos de imidazol como imidazol-1-ilo e imidazol-3-ilo (ambos unidos por N), e imidazol-2-ilo, imidazol-4-ilo e imidazol-5-ilo (todos los cuales están unidos por C).

A menos que se indique lo contrario, un "heteroarilo $\text{C}_3\text{-C}_8$ " es un heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ aromático en el que el subíndice indica el número total de carbonos del sistema de anillo cíclico del heterociclo o el número total de compuestos aromáticos carbonos del sistema de anillos aromáticos del heteroarilo y no implica el tamaño del sistema de anillos ni la presencia o ausencia de fusión de anillos. Los ejemplos representativos de un heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ incluyen, entre otros, pirrolidinilo, azetidínilo, piperidinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo, tiofenilo (tiofeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, pirimidinilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo e isoxazolilo. Cuando se da explícitamente, el tamaño del sistema de anillo de un heterociclo o heteroarilo se indica mediante el número total de átomos en el anillo. Por ejemplo, la designación como heteroarilo de 5 o 6 miembros indica el número total de átomos aromáticos (es decir, 5 o 6) en el sistema de anillo heteroaromático del heteroarilo, pero no implica el número de heteroátomos aromáticos o carbonos aromáticos en ese sistema de anillos. Los heteroarilos fusionados se establecen o implican explícitamente por el contexto como tales y normalmente se indican por el número de átomos aromáticos en cada anillo aromático que se fusionan para formar el sistema de anillos heteroaromáticos fusionados. Por ejemplo, un heteroarilo de 5,6 miembros es un anillo aromático de 5 miembros fusionado con un anillo aromático de 6 miembros en el que uno o ambos anillos tienen heteroátomo(s) aromático(s) o donde un heteroátomo se comparte entre los dos anillos.

Un heterociclo fusionado con un arilo o heteroarilo de manera que el heterociclo permanece no aromático y es parte de una estructura más grande a través de la unión con la porción no aromática del sistema de anillos fusionados es un ejemplo de un heterociclo opcionalmente sustituido en el que el heterociclo se sustituye por fusión del anillo con el arilo o el heteroarilo. Del mismo modo, un arilo o heteroarilo condensado con heterociclo o carbociclo que forma parte de una estructura más grande mediante la unión con la porción aromática del sistema de anillos fusionados es un ejemplo de un arilo o heterociclo opcionalmente sustituido en el que el arilo o heterociclo está sustituido por fusión de anillos. con el heterociclo o carbociclo.

A menos que se indique lo contrario, "heterociclo C₃-C₈", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un heterocíclico C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del heterociclo se reemplaza con un enlace (es decir, es divalente). A menos que se indique lo contrario, un "heteroarileno C₃-C₈", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo heteroarilo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heteroarilo se reemplaza con un enlace (es decir, es divalente).

A menos que se indique lo contrario, un "carbociclo C₃-C₈", por sí mismo o como parte de otro término, es un monovalente de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, anillo carbocíclico monocíclico o bicíclico no aromático, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo anular de un sistema anular original. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, entre otros, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, cicloheptilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1, 3,5-cicloheptatrienilo, ciclooctilo y ciclooctadienilo.

A menos que se indique lo contrario, un "carbociclo C₃-C₈", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo se reemplaza con un enlace (es decir, es divalente).

A menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquilo", solo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada, o combinaciones de los mismos, completamente saturado o que contiene de 1 a 3 grados de insaturación, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a diez, preferiblemente de uno a tres, heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el nitrógeno el heteroátomo puede estar opcionalmente cuaternizado. El (los) heteroátomo(s) O, N y S pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. El heteroátomo Si puede colocarse en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluida la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -NH-CH₂-CH₂-NHC(O)-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=NO-CH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. Normalmente, un heteroalquilo o heteroalquilenos C₁ a C₄ tiene de 1 a 4 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos y un heteroalquilo o heteroalquilenos C₁ a C₃ tiene de 1 a 3 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos. En algunos aspectos, un heteroalquilo o heteroalquilenos está saturado.

A menos que se indique lo contrario, el término "heteroalquilenos" por sí mismo o en combinación con otro término significa un grupo divalente derivado de heteroalquilo (como se discutió anteriormente), como se ejemplifica por -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-SCH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquilenos, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos extremos de la cadena. Aún más, para los grupos de enlace alquilenos y heteroalquilenos, no se implica la orientación del grupo de enlace.

A menos que se indique lo contrario, "aminoalquilo" por sí mismo o en combinación con otro término significa un heteroalquilo en el que un resto alquilo como se define en el presente documento está sustituido con un grupo amino, alquilamino, dialquilamino o cicloalquilamino. Ejemplos de aminoalquilos no limitantes son -CH₂ NH₂, -CH₂CH₂ NH₂, -CH₂CH₂ NHCH₃ y -CH₂CH₂N(CH₃)₂ y además incluye especies ramificadas tales como -CH(CH₃)NH₂ y -C(CH₃)CH₂NH₂ en la configuración (R) o (S). Alternativamente, un aminoalquilo es un resto, grupo o sustituyente alquilo como se define en el presente documento, en el que un carbono sp³ distinto del carbono radical ha sido reemplazado por un resto amino o alquilamino en el que su átomo de nitrógeno sp³ reemplaza al átomo de carbono sp³ del alquilo, siempre que al menos quede un átomo de carbono sp³. Cuando se hace referencia a un resto aminoalquilo como sustituyente de una estructura mayor u otro resto, el aminoalquilo se une covalentemente a la estructura o resto a través del radical de carbono del resto alquilo del aminoalquilo.

A menos que se indique lo contrario, "alquilamino" y "cicloalquilamino" por sí mismos o en combinación con otro término significan un radical alquilo o cicloalquilo, como se describe en el presente documento, en el que el radical carbono del radical alquilo o cicloalquilo se ha reemplazado con un radical nitrógeno, siempre que al menos queda un carbono sp³. En aquellos casos en los que el alquilamino está sustituido en su nitrógeno con otro resto alquilo, el radical sustituido resultante a veces se denomina resto, grupo o sustituyente dialquilamino en el que los restos alquilo que sustituyen al nitrógeno se seleccionan independientemente. Los sustituyentes amino, alquilamino y dialquilamino ejemplares y no limitativos incluyen aquellos que tienen la estructura de -N(R^{op})₂, donde R^{op} en estos ejemplos se seleccionan independientemente de hidrógeno o alquilo C₁₋₆, típicamente hidrógeno o metilo, mientras que, en las cicloalquilaminas, que están incluidas en los heterocicloalquilos, tanto R^{op} como el nitrógeno al que están unidos definen un anillo heterocíclico. Cuando ambos R^{op} son hidrógeno o alquilo, el resto a veces se describe como un grupo amino primario y un grupo amino terciario, respectivamente. Cuando una R^{op} es hidrógeno y la otra es alquilo, entonces el resto se describe a veces como un grupo amino secundario. Los restos alquilamino primarios y secundarios son más reactivos como nucleófilos hacia los centros electrofílicos que contienen carbonilo, mientras que las aminas terciarias son más básicas.

"Alquilo sustituido" y "arilo sustituido" significan alquilo y arilo, respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno, normalmente uno, se reemplazan cada uno independientemente con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, entre otros, una unidad básica, una unidad PEG, -X, -R^{op}, -OH, -OR^{op}, -SR^{op}, -N(R^{op})₂, -N(R^{op})₃, =NR^{op}, -CX₃, -

5 CN, -NO₂, -NR^{OP}C(=O)R^{OP}, -C(=O)R^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -S(=O)₂R^{OP}, -S(=O)₂NR^{OP}, -S(=O)R^{OP}, -OP(=O)(OR^{OP})₂, -P(=O)(OR^{OP})₂, -PO₃⁻³, PO₃H₂, -C(=O)R^{OP}, -C(=S)R^{OP}, -CO₂R^{OP}, -CO₂⁻, -C(=S)OR^{OP}, -C(=O)SR^{OP}, -C(=S)SR^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -C(=S)_n(R^{OP})₂, y -C(=NR)_n(R^{OP})₂, donde cada X se selecciona independientemente del grupo que consiste en un halógeno: -F, -Cl, -Br e -I; y donde cada R^{OP} se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₂₀, -arilo C₆-C₂₀, -heterociclo C₃-C₁₄, un grupo protector y un resto profármaco.

10 Más típicamente, los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste en una unidad básica, una unidad PEG -X, -R^{OP}, -OH, -OR^{OP}, -SR^{OP}, -N(R^{OP})₂, -N(R^{OP})₃, =NR^{OP}, -NR^{OP}C(=O)R^{OP}, -C(=O)R^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -S(=O)₂R^{OP}, -S(=O)₂NR^{OP}, -S(=O)R^{OP}, -C(=O)R^{OP}, -C(=S)R^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -C(=S)_n(R^{OP})₂, y -C(=NR)_n(R^{OP})₂, donde cada X es independientemente seleccionado del grupo que consta de -F y -Cl, o se seleccionan del grupo que consta de una unidad básica, una unidad PEG -X, -R^{OP}, -OH, -OR^{OP}, -N(R^{OP})₂, -N(R^{OP})₃, -NR^{OP}C(=O)R^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -S(=O)₂R^{OP}, -S(=O)₂NR^{OP}, -S(=O)R^{OP}, -C(=O)R^{OP}, -C(=O)_n(R^{OP})₂, -C(=NR)_n(R^{OP})₂, un grupo protector y un resto de profármaco en el que cada X es -F; y donde cada R^{OP} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, -alquilo C₁-C₂₀, -arilo C₆-C₂₀, -heterociclo C₃-C₁₄, un grupo protector y un resto profármaco. En algunos aspectos, un sustituyente alquilo se selecciona del grupo que consiste en -N(R^{OP})₂, -N(R^{OP})₃ y -C(=NR)_n(R^{OP})₂, donde R^{OP} es el definido anteriormente, que puede proporcionar una Unidad Básica como cuando R^{OP} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo -C₁-C₂₀. En otros aspectos, el alquilo se sustituye con una serie de restos etilenoxi para definir una Unidad PEG. Los grupos alquilenos, carbociclos, carbociclos, arileno, heteroalquilo, heteroalquilenos, heterociclos, heterociclos, heteroarilo y heteroarileno como se ha descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de manera similar.

20 "Grupo protector", como se usa aquí, significa un resto que evita o reduce la capacidad del átomo o grupo funcional al que está unido de participar en reacciones no deseadas. Los grupos protectores típicos para átomos o grupos funcionales se dan en Greene (1999), "Protective groups in organic synthesis, 3rd ed.", Wiley Interscience. Los grupos protectores para heteroátomos como el oxígeno, el azufre y el nitrógeno se usan a veces para minimizar o evitar sus reacciones no deseadas con compuestos electrofílicos. Otras veces, el grupo protector se usa para reducir o eliminar la nucleofilia y/o la basicidad del heteroátomo desprotegido. Los ejemplos no limitantes de oxígeno protegido se dan mediante -OR^{PR}, donde R^{PR} es un grupo protector para hidroxilo, donde el hidroxilo está típicamente protegido como un éster (por ejemplo, acetato, propionato o benzoato). Otros grupos protectores para hidroxilo evitan interferir con la nucleofiliidad de reactivos organometálicos u otros reactivos altamente básicos, donde el hidroxilo es típicamente protegido como un éter, incluidos los éteres alquílicos o heterocicloalquílicos (p. ej., éteres metílicos o tetrahidropiránílicos), éteres alcoximetílicos (p. ej., éteres metoximetílicos o etoximetílicos), éteres arílicos opcionalmente sustituidos y éteres silílicos (p. ej., trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), terc-butildifenisililo (TBDPS), terc-butildimetilsililo (TBS/TBDMS), triisopropilsililo (TIPS) y [2-(trimetilsilil)etoxi]-metilsililo (SEM)). Los grupos protectores de nitrógeno incluyen aquellos para aminas primarias o secundarias como en -NHR^{PR} o -N(R^{PR})₂, donde al menos uno de R^{PR} es un grupo protector de átomo de nitrógeno o ambos R^{PR} juntos comprenden un grupo protector.

40 Un grupo protector es un protector adecuado cuando es capaz de prevenir o evitar reacciones secundarias no deseadas o la pérdida prematura del grupo protector en las condiciones de reacción requeridas para efectuar la transformación química deseada en otra parte de la molécula y durante la purificación de la molécula recién formada. cuando se desee, y se puede eliminar en condiciones que no afecten negativamente a la estructura o integridad estereoquímica de esa molécula recién formada. A modo de ejemplo y no de limitación, un grupo protector adecuado puede incluir los descritos previamente para proteger grupos funcionales. Un grupo protector adecuado es a veces un grupo protector usado en reacciones de acoplamiento de péptidos.

45 "Alcohol aromático" por sí mismo o como parte de una estructura más grande se refiere a un sistema de anillo aromático sustituido con el grupo funcional hidroxilo -OH. Por lo tanto, alcohol aromático se refiere a cualquier resto arilo, heteroarilo, arileno y heteroarileno como se describe en el presente documento que tiene un grupo funcional hidroxilo unido a un átomo de carbono aromático de su sistema de anillo aromático. El alcohol aromático puede ser parte de un resto más grande como cuando su sistema de anillos aromáticos es un sustituyente de este resto, o puede estar incrustado en el resto más grande por fusión del anillo, y puede estar opcionalmente sustituido con restos como se describe en este documento que incluye uno o más otros sustituyentes hidroxilo. Un alcohol fenólico es un alcohol aromático que tiene un grupo fenilo como anillo aromático.

55 "Alcohol alifático" por sí mismo o como parte de una estructura más grande se refiere a un resto que tiene un carbono no aromático unido al grupo funcional hidroxilo -OH. El átomo de carbono que lleva hidroxilo puede no estar sustituido (es decir, alcohol metílico) o puede tener uno, dos o tres sustituyentes alquilo ramificados o no ramificados opcionalmente sustituidos para definir un alcohol primario, o un alcohol alifático secundario o terciario dentro de una estructura lineal o cíclica. Cuando forma parte de una estructura más grande, el alcohol puede ser un sustituyente de esta estructura uniéndose a través del carbono que contiene hidroxilo, a través de un átomo de carbono de un alquilo u otro resto como se describe en este documento a este carbono que contiene hidroxilo o a través de un sustituyente de este alquilo u otro resto. Un alcohol alifático contempla una estructura cíclica no aromática (es decir, carbociclos y heterocarbociclos, opcionalmente sustituidos) en la que un grupo funcional hidroxilo está unido a un átomo de carbono no aromático de su sistema de anillo cíclico.

65 "Arilalquilo" o "heteroarilalquilo", como se usa en el presente documento, significa un sustituyente, resto o grupo en el que un resto arilo está unido a un resto alquilo, es decir, aril-alquilo, donde los grupos alquilo y arilo son como se describe

anteriormente, p. ej. $C_6H_5-CH_2-$ o $C_6H_5-CH(CH_3)CH_2-$. Un arilalquilo o heteroarilalquilo está asociado con una estructura o resto más grande a través de un átomo de carbono sp^3 de su resto alquilo.

"Grupo atractor de electrones", como se usa en el presente documento, significa un grupo funcional o un átomo electronegativo que extrae la densidad de electrones de un átomo al que está unido ya sea por inducción y/o por resonancia, lo que sea más dominante (es decir, un grupo funcional o el átomo puede retirar electrones de manera inductiva, pero, en general, puede donar electrones a través de resonancia), y tiende a estabilizar aniones o fracciones ricas en electrones. El efecto de extracción de electrones generalmente se transmite de manera inductiva, aunque en forma atenuada, a otros átomos unidos al átomo enlazado que se ha vuelto deficiente en electrones por el grupo de extracción de electrones (EWG), lo que afecta la electrofilia de un centro reactivo más remoto. Los ejemplos de grupos atractores de electrones incluyen, entre otros, $-C(=O)$, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$, $-X$, $-C(=O)OR^{op}$, $-C(=O)_n(R^{op})_2$, $-C(=O)R^{op}$, $-C(=O)X$, $-S(=O)_2R^{op}$, $-S(=O)_2OR^{op}$, $-S(=O)_2NHR^{op}$, $-S(=O)_2N(R^{op})_2$, $-P(=O)(OR^{op})_2$, $-P(=O)(CH_3)NHR^{op}$, $-NO$, $-N(R^{op})_3^+$, donde X es $-F$, $-Br$, $-Cl$ o $-I$, y R^{op} en algunos aspectos es, en cada aparición, seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C_{1-6} y ciertos restos enlazados a O como se describe aquí tal como aciloxi.

Los EWG ejemplares también pueden incluir grupos arilo (p. ej., fenilo) dependiendo de la sustitución y ciertos grupos heteroarilo (p. ej., piridina). Por lo tanto, el término "grupos atractores de electrones" también incluye arilos o heteroarilos que están además sustituidos con grupos atractores de electrones. Típicamente, los grupos atractores de electrones en arilos o heteroarilos son $-C(=O)$, $-CN$, $-NO_2$, $-CX_3$ y $-X$, en donde X seleccionado independientemente es halógeno, típicamente $-F$ o $-Cl$. Dependiendo de sus sustituyentes, un resto alquilo también puede ser un grupo atractor de electrones.

"Grupo donador de electrones", como se usa en el presente documento, significa un grupo funcional o átomo electropositivo que aumenta la densidad de electrones de un átomo al que está unido inductivamente y/o por resonancia, cualquiera que sea más dominante (es decir, un grupo funcional o átomo puede ser donador de electrones a través de la resonancia, pero en general puede retirar electrones de forma inductiva) y tiende a estabilizar los cationes o los sistemas pobres en electrones. El efecto de donación de electrones generalmente se transmite a través de resonancia a otros átomos unidos al átomo enlazado que se ha vuelto rico en electrones por el grupo donador de electrones (EWG), lo que afecta la nucleofilia de un centro reactivo más remoto. Los ejemplos de grupos donantes de electrones incluyen, pero no se limitan a aminas y ciertos sustituyentes con enlace O como se describe en este documento, tales como $-OH$ y éteres. Dependiendo de sus sustituyentes, un resto arilo o heteroarilo también puede ser un grupo donador de electrones. Los restos alquilo no sustituidos suelen ser donantes de electrones.

Como se usa en el presente documento, "resto unido a O" significa un resto que está unido a una estructura o resto más grande directamente a través de un átomo de oxígeno del resto unido a O. Un resto unido a O puede ser un resto monovalente, incluidos restos como hidroxilo, es decir, $-OH$, acetoxi, es decir, $-O-C(=O)CH_3$, aciloxi, es decir, $-O-C(=O)R$, donde R es hidrógeno, o alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, arilo o heterociclo, opcionalmente sustituido, y ariloxi (Arl-O-), fenoxi (Ph-O-) y heteroariloxi (heteroaril-O), opcionalmente sustituido, o sililoxi, es decir, R^3SiO- , donde R independientemente son alquilo, arilo o heteroarilo, opcionalmente sustituido, un éter, es decir, $-OR$, donde R es como se define para sililoxi, y $-OR^{PR}$, donde R^{PR} es un grupo protector como se definió previamente. Un resto monovalente con enlace O puede donar o retirar electrones dependiendo de la electronegatividad del heteroátomo de oxígeno enlazado y la disponibilidad de sus pares de electrones solitarios. Por ejemplo, $-OH$ o un éter, cuando su átomo de oxígeno es un sustituyente de un átomo de carbono, es un resto donador de electrones, mientras que un aciloxi sustituido de forma similar es un resto atractor de electrones. Un resto unido a O también puede ser divalente, es decir, $=O$ o un resto cetral, por ejemplo, $-X-(CH_2)_n-Y-$, en el que X e Y son independientemente S y O y n es 2 a 3, para formar un sistema de anillo espiro con el carbono al que están unidos X e Y.

La "capacidad de grupo saliente" se refiere a la capacidad de un compuesto que contiene alcohol, tiol, amina o amida correspondiente a una unidad de fármaco en un ligando conjugado de fármaco para liberarse del conjugado como fármaco libre después de la activación de un evento de autoinmolación dentro del Conjugado. Esa liberación puede ser variable sin el beneficio de una unidad de carbamato de metileno a la que se une su unidad de fármaco (es decir, cuando la unidad de fármaco está directamente unida a un resto auto-inmolador y no tiene una unidad de carbamato de metileno intermedia). Los buenos grupos salientes suelen ser bases débiles y cuanto más ácido es el grupo funcional que se expulsa de dichos conjugados, más débil es la base conjugada. Por lo tanto, la capacidad del grupo saliente de un fármaco libre que contiene alcohol, tiol, amina o amida de una Unidad de Fármaco estará relacionada con el pKa del grupo funcional del fármaco que se expulsa de un conjugado en los casos en que una unidad de carbamato de metileno (es decir, uno en el que una Unidad de Fármaco está unida directamente a un resto de autoinmolación) no se usa. Por lo tanto, un pKa más bajo para ese grupo funcional aumentará su capacidad de grupo saliente. Aunque otros factores pueden contribuir a la liberación del fármaco libre de los conjugados que no tienen el beneficio de una unidad de carbamato de metileno, generalmente un fármaco que tiene un grupo funcional con un valor de pKa más bajo será un mejor grupo saliente que un fármaco unido a través de un grupo funcional con un valor de pKa más bajo. un valor de pKa más alto. Otra consideración es que un grupo funcional que tiene un valor de pKa demasiado bajo puede dar como resultado un perfil de actividad inaceptable debido a la pérdida prematura de la Unidad de Fármaco a través de la hidrólisis espontánea. Para los conjugados que emplean una unidad de carbamato de metileno, se produce tras la autoinmolación un grupo funcional común (es decir, un ácido carbámico) que tiene un valor de pKa que permite la liberación eficiente del fármaco libre, sin sufrir una pérdida inaceptable de Unidad de fármaco.

El "resto de succinimida", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto orgánico compuesto por un sistema de anillo de succinimida, que está presente en un tipo de Unidad Estiradora (Z) que normalmente está compuesta además por un resto que contiene alquileo unido al nitrógeno de imida de ese sistema de anillos. Un resto de succinimida resulta típicamente de la adición de Michael de un grupo sulfhidrido de una Unidad de Ligando (ligando de dirección) al sistema de anillo de maleimida de un precursor de Unidad Estiradora (Z'). Por lo tanto, un resto de succinimida se compone de un sistema de anillo de succinimida sustituido con tio y, cuando está presente en un LDC, tiene su nitrógeno de imida sustituido con el resto de la Unidad Enlazadora del LDC y está opcionalmente sustituido con sustituyentes que estaban presentes en la maleimida. sistema de anillos de Z'.

El "resto ácido-amida" como se usa aquí se refiere al ácido succínico que tiene un sustituyente amida que resulta del sistema de anillo de succinimida sustituido con tio de un resto succinimida que ha sufrido la rotura de uno de sus enlaces carbonilnitrógeno por hidrólisis. La hidrólisis que da como resultado un resto de ácido succínico-amida proporciona una Unidad Enlazadora menos propensa a sufrir una pérdida prematura de la Unidad de Ligando a la que está unida mediante la eliminación del sustituyente anticuerpo-tio. Se espera que la hidrólisis del sistema de anillos de succinimida del resto de succinimida sustituido con tio proporcione isómeros regioquímicos de restos de ácido-amida que se deben a las diferencias en la reactividad de los dos carbonos de carbonilo del sistema de anillos de succinimida atribuibles, al menos en parte, a cualquier sustituyente presente en el sistema de anillos de maleimida de la Camilla precursor y al sustituyente tio introducido por el ligando dirigido.

El término "profármaco", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto biológicamente menos activo o inactivo que se transforma dentro del cuerpo en un compuesto más biológicamente activo mediante un proceso químico o biológico (es decir, una reacción química o una biotransformación enzimática). Normalmente, un compuesto biológicamente activo se vuelve menos activo biológicamente (es decir, se convierte en un profármaco) modificando químicamente el compuesto con un resto de profármaco. En algunos aspectos, el profármaco es un profármaco de tipo II, que se bioactiva fuera de las células, por ejemplo, en los fluidos digestivos, o en el sistema de circulación del cuerpo, por ejemplo, en la sangre. Ejemplos de profármacos son ésteres y β -D-glucopiranosidos.

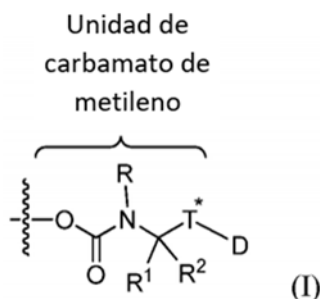
Formas de realización

A continuación se describen varias formas de realización de la invención, que no pretenden limitar la invención de ningún modo, y van seguidas de una discusión más detallada de los componentes que forman los conjugados. Un experto en la técnica entenderá que cada uno de los conjugados identificados y cualquiera de sus formas de realización seleccionadas pretende incluir el alcance completo de cada componente y enlazador.

Conjugados de fármaco-ligando

En un grupo de formas de realización, se proporcionan aquí conjugados de fármaco-ligando (LDC) y composiciones de los mismos que comprenden poblaciones de estos LDC (es decir, composiciones de LDC).

En un aspecto, un conjugado de ligando-fármaco comprende una Unidad de Ligando, una unidad de fármaco y una Unidad de Enlazadora que conecta la Unidad de Ligando a la unidad de fármaco, en el que la Unidad de Enlazadora se compone de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora a través de la cual la Unidad de Ligando está conectada a la Unidad de Fármaco. La Unidad de Fármaco está unida directamente a una unidad de carbamato de metileno de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, donde la unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una Unidad de Fármaco en el Conjugado de Ligando y Fármaco tiene la estructura de Fórmula I:



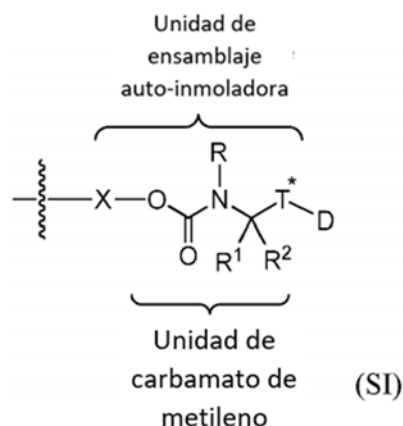
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
donde

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno:

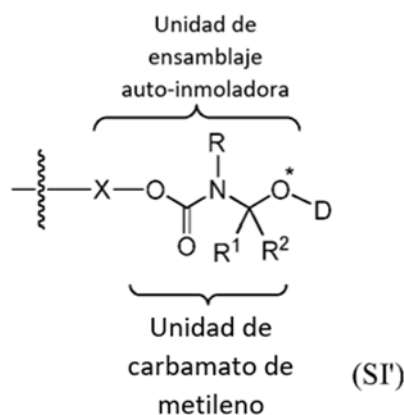
T* es un átomo de oxígeno de dicha función que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno; R, R¹ y R² son hidrógeno; y

la línea ondulada indica la unión covalente de la estructura de Fórmula I al resto de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (es decir, la unión dentro de la LDC), y en donde la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora libera el fármaco libre (es decir, DT*H) después de activación de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora.

- 5 En algunas formas de realización de Fórmula I, el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H. En otras formas de realización de Fórmula SI, el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 36 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H.
- 10 Por lo general, la unidad de carbamato de metileno se une a un resto auto-inmolador activable, X, como se representa mediante la Fórmula (SI):



- 30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; donde la línea ondulada indica la unión covalente de la estructura de Fórmula SI dentro de la LDC; R, R¹, R², T* y D son como se definen para la Fórmula I; X es un resto auto-inmolador activable; y en el que la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora indicada libera fármaco libre (es decir, DT*H) después de la activación de X.
- 35 En algunas formas de realización de Fórmula I, el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 36 para su T*H grupo funcional. En otras formas de realización de Fórmula SI, el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 36 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H.
- 40 En todas las formas de realización, la unidad de carbamato de metileno es una Unidad MAC. En esas formas de realización, D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno. En dichas formas de realización, la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora unida covalentemente a la Unidad de fármaco está representada por la Fórmula SI':



- 60 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde la línea ondulada, X, R, R¹ y R² son como se definen para la Fórmula SI, D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo antes de su incorporación en la unidad de carbamato de metileno indicada y O* es el átomo de oxígeno de dicha función hidroxilo; y en el que la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora indicada libera fármaco libre (es decir, DO*H) después de la activación de X.
- 65

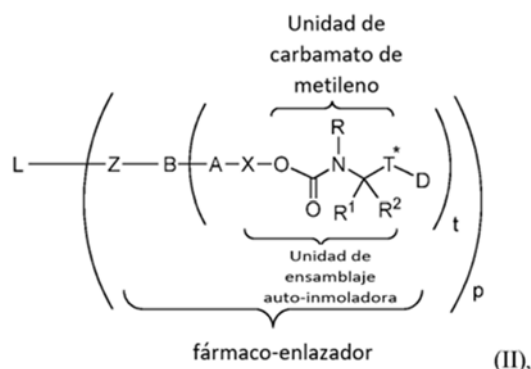
En algunas formas de realización de Fórmula SI', el DO*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 19 para su grupo funcional hidroxilo. En otras formas de realización de Fórmula I, el DO*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 19 o entre 15 y aproximadamente 19 para su grupo funcional hidroxilo.

En un aspecto, un conjugado de ligando-fármaco comprende una Unidad de Ligando, una unidad de fármaco y una Unidad de Enlazadora que conecta la Unidad de Ligando a la unidad de fármaco, en el que la Unidad de Enlazadora está compuesta por una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora y una Unidad Estiradora. El fármaco se incorpora a un resto enlazador de fármaco de una LDC mediante la incorporación de un grupo funcional hidroxilo del fármaco a través del átomo de oxígeno de ese grupo funcional a una unidad de carbamato de metileno de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. A continuación, la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora se conecta a la Unidad de Ligando a través de la Unidad Estiradora.

En algunas formas de realización, puede haber de 1 a 4 Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras dentro de un resto enlazador de fármacos para cada sitio de unión a una Unidad de Ligando (representado por el subíndice t) y de 1 a 16 restos enlazadores de fármacos por Unidad de Ligando (representada por el subíndice p). En aquellas formas de realización en las que hay dos o más Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras conectadas a cada sitio de unión en la Unidad de Ligando, una Unidad de Ramificación está presente para permitir la ramificación requerida.

En algunos aspectos, una Unidad Conectora adicional (A) une covalentemente una Unidad Estiradora (Z) o una Unidad de Ramificación (B), dependiendo de la presencia o ausencia de B, a una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora.

En algunas formas de realización, un conjugado de ligando-fármaco, o una composición del mismo que comprende una población de estos LDC (es decir, una composición de LDC), se representa mediante la Fórmula II a continuación:



o una sal farmacéuticamente aceptable; donde D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno;

T* es un átomo de oxígeno de dicha función que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

X es un resto auto-inmolador activable;

L es una Unidad de Ligando;

Z es una Unidad Estiradora;

B es una Unidad de Ramificación opcional que está presente cuando el subíndice t es 2, 3 o 4, y está ausente cuando el subíndice t es 1;

A es una Unidad Conectora opcional;

el subíndice s es 1 o 2;

el subíndice t varía de 1 a 4; y

el subíndice p es un número entero (para un LDC individual) o un número (para una población de LDC) que va de 1 a 16;

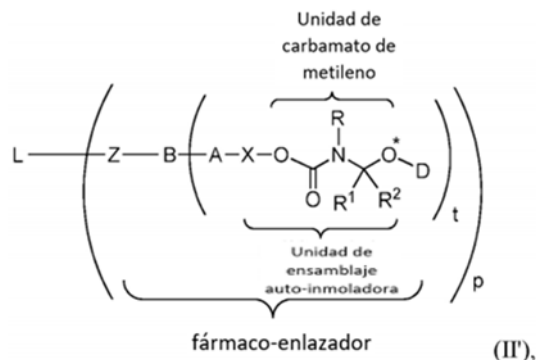
y en el que la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora indicada libera fármaco libre (es decir, DT* H) después de la activación de X.

En algunas formas de realización de Fórmula I, el DT* H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 36 para su Grupo funcional T*H. En otras formas de realización de Fórmula SI, el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 36 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H.

Los fármacos a utilizar en la presente invención incluyen fármacos que contienen alcohol (p. ej., hidroxilo aromático y alifático). La unión de una Unidad de Fármaco a la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora se produce a partir de la incorporación del fármaco a través del átomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del fármaco que contiene alcohol. Tal átomo de oxígeno se designa por T*. Se entenderá que mientras que la incorporación del fármaco es a través de una

funcionalidad de alcohol (es decir, a través del heteroátomo de oxígeno de un grupo funcional hidroxilo), el fármaco puede tener funcionalidades de alcohol adicionales o funcionalidades de tiol, amina o amida que no están tan unidas.

La unidad de carbamato de metileno en la Fórmula II puede ser una unidad de carbamato de alcoxi(ariloxi) de metileno (unidad MAC) como se muestra en la Fórmula II' a continuación.



o una sal farmacéuticamente aceptable; en donde

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo antes de su incorporación en la unidad carbamato de alcoxi(ariloxi) de metileno indicada (Unidad MAC), cuyo átomo de oxígeno se designa con O*;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

X es un resto auto-inmolador activable;

L es una Unidad de Ligando;

Z es una Unidad Estiradora;

B es una Unidad de Ramificación opcional que está presente cuando el subíndice t es 2, 3 o 4, y está ausente cuando el subíndice t es 1;

A es una Unidad Conectora opcional;

el subíndice s es 1 o 2;

el subíndice t varía de 1 a 4;

el subíndice s es 0, 1, 2 o 3 y

el subíndice p es un número entero (para un LDC individual) o un número (para una población de LDC) que va del 1 al 16; y

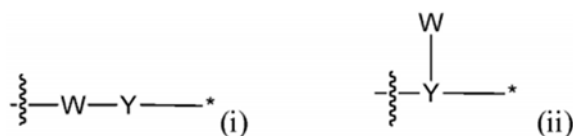
en el que la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora indicada libera fármaco libre (es decir, DO*H) después de la activación de X.

En algunas formas de realización de Fórmula II', el DO*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 19 para su grupo funcional hidroxilo. En otras formas de realización de Fórmula II', el DO*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 19 o entre 15 y aproximadamente 19 para su grupo funcional hidroxilo.

En algunas formas de realización de Fórmula IIb', preferiblemente el subíndice s es 0, 1 o 2; más preferiblemente 1 o 2.

El grupo funcional hidroxilo al que se hace referencia en el presente documento puede ser el grupo funcional hidroxilo de un alcohol aromático o un alcohol alifático. El alcohol alifático puede ser un alcohol alifático primario, secundario o terciario. Preferiblemente, el alcohol es un alcohol alifático, más preferiblemente un alcohol alifático primario o secundario.

Una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora comprende, además de una unidad de carbamato de metileno, un resto auto-inmolador activable. Ese resto activable está compuesto por una Unidad de Activación y una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. La Unidad Espaciadora puede comprender una o varias subunidades espaciadoras auto-inmoladoras, cada una capaz de auto-inmolarse (por ejemplo, de 1 a 4). La Unidad de Activación inicia una secuencia de reacción de autoinmolación dentro de la Unidad Espaciadora o una subunidad de la misma que da como resultado la liberación de fármaco libre. La Unidad de Activación o la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (A) pueden proporcionar el sitio de unión covalente a A, B o Z dentro de un LDC o un Intermedio del mismo dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B. En algunas formas de realización el resto de autoinmolación (X), de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora se representa como sigue mediante la Fórmula i o ii



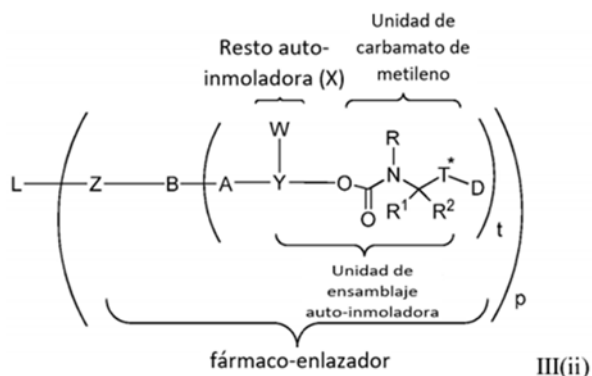
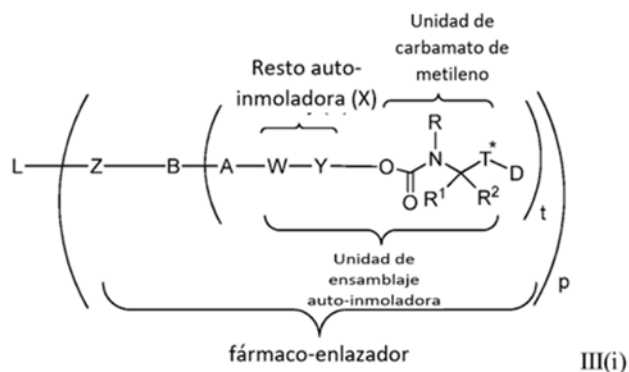
en la que

W es una Unidad de Activación; e

Y es una Unidad Espaciadora auto-inmoladora;

y la línea ondulada indica el sitio de unión al resto del conjugado (es decir, a A, B o Z dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B) y el asterisco (*) indica el sitio de unión al conector de carbamato de metileno.

En algunos aspectos, un conjugado de ligando-fármaco (LDC), o una composición del mismo que se compone de una población de estos LDC (es decir, una composición de LDC), está representado por la Fórmula III (i) o III (ii):



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde

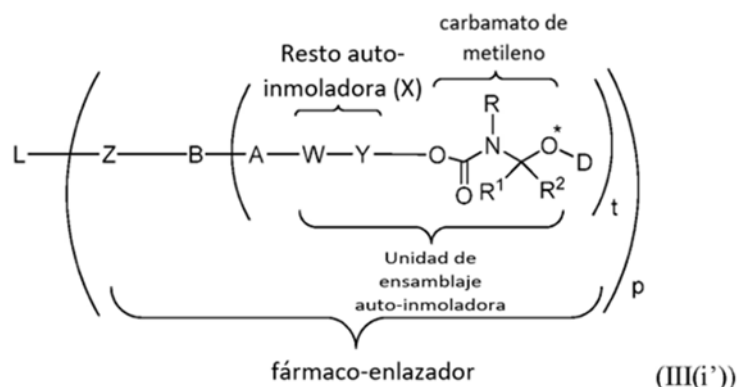
W es una Unidad de Activación;

Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora; y

L, Z, B, A, R, R¹, R², T*, D y los subíndices t, s y p son como se definen para las Fórmulas II, IIa y IIb.

En algunas formas de realización de Fórmula III(i) o III(ii), el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 9 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H. En otras formas de realización de Fórmula III(i) o III(ii), el DT*H liberado tiene un pKa de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 36 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 36 para su grupo funcional T*H.

La unidad de carbamato de metileno en las Fórmulas III (i) o III (ii) es una unidad de carbamato de alcoxi(ariloxi) de metileno (Unidad MAC) como se muestra en la Fórmula III(i)' o III(ii)' a continuación:



en 1-10 de este párrafo W es un azúcar o un carbohidrato con enlace glucosídico,

13) activación del resto auto-inmolador activable (X) es por escisión enzimática dentro de W o escisión enzimática del enlace peptídico entre W y la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y), y en cualquiera de las formas de realización expuestas en 1-10 o En este párrafo, la activación del resto auto-inmolador activable es por escisión enzimática

dentro de W o escisión enzimática del enlace peptídico entre W y la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y),

14) la activación del resto auto-inmolador activable es por una reducción de disulfuro (es decir, W está compuesto por un grupo funcional disulfuro reducible que involucra un sustituyente de átomo de azufre de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora), y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-10 de este párrafo en donde la activación del resto auto-inmolador activable es por una reducción de disulfuro (es decir, W está compuesto por un grupo funcional disulfuro reducible que involucra un átomo de azufre sustituyente de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora),

15) la Unidad de Activación es un azúcar o un carbohidrato con enlace glucosídico y la unión de la Unidad de Ligando dentro de su LDC es a través de la Unidad Espaciadora (Y) auto-inmoladora, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-10 de este párrafo, la Unidad de Activación es un azúcar o un glicosido. carbohidrato con enlace c y la unión de la Unidad de Ligando dentro de su LDC es a través de Y,

16) la Unidad de Activación se compone de 1 a no más de 12 residuos de aminoácidos y la unión de la Unidad de Ligando es a través de la Unidad de Activación, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-10 de este párrafo, en donde la Unidad de Activación está compuesta de 1 a no más de 12 residuos de aminoácidos y la unión de la Unidad de Ligando es a través de la Unidad de Activación,

17) T* u O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una Unidad de Fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol alifático, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-16 de este párrafo, T* o O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unido covalentemente a una Unidad de fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol alifático,

18) T* u O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unido covalentemente a una Unidad de fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol aromático, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-16 de este párrafo, T* u O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unido covalentemente a una unidad de fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol aromático,

19) T* u O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una unidad de fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol aromático en el que el alcohol aromático no es un alcohol fenólico, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-16 de este párrafo, T* u O* es un átomo de oxígeno de una Unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una Unidad de Fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional de un fármaco que contiene alcohol aromático, donde el alcohol aromático no es un alcohol fenólico,

20) T* es el heteroátomo de oxígeno de una Unidad MAC covalentemente unida a una Unidad de Fármaco correspondiente al heteroátomo de un grupo funcional hidroxilo de un fármaco que contiene alcohol alifático o aromático, y en cualquiera de las formas de realización establecidas en 1-16 de este párrafo, T* es el átomo de oxígeno de Unidad MAC unida covalentemente a una Unidad de Fármaco correspondiente al átomo de oxígeno de un grupo funcional hidroxilo de un fármaco que contiene alcohol alifático o aromático, y donde la Unidad de Ensamblaje SI auto-inmoladora compuesta por la Unidad MAC unida covalentemente a la Unidad de Fármaco es capaz de liberar un fármaco que contiene alcohol alifático o aromático,

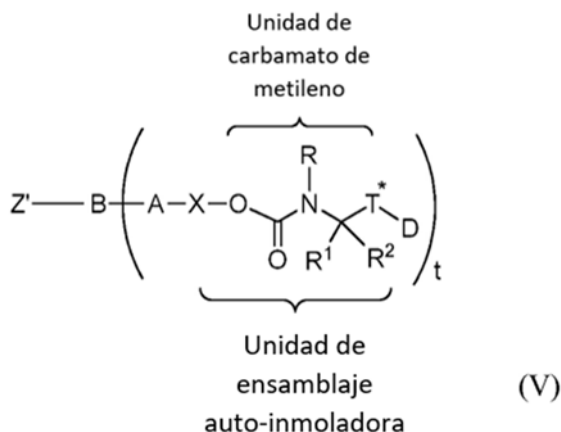
21) T* u O* es un átomo de oxígeno de una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una Unidad de fármaco correspondiente al átomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del fármaco everolimus, tacrolimus o sirolimus.

Compuestos de fármaco-enlazador

En algunos aspectos, cuando se diseñan los conjugados de ligando-fármaco, será deseable sintetizar el fármaco-enlazador completo antes de la conjugación con un ligando dirigido. En dichas formas de realización, los Compuestos Enlazadores de Fármacos actúan como compuestos intermedios. La Unidad Estiradora en un Compuesto de Fármaco-Enlazador aún no está unida covalentemente a la Unidad de Ligando y por lo tanto tiene un grupo funcional para la conjugación con un ligando dirigido (es decir, es un precursor de la Unidad Estiradora, Z'). En un aspecto, un Compuesto Enlazador de Fármaco comprende una Unidad de Fármaco, y una Unidad Enlazadora que comprende una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora a través de la cual la Unidad de Ligando se va a conectar a la Unidad de Fármaco. La Unidad Enlazadora comprende, además de la Unidad de Ensamblaje SI, un precursor de la Unidad Estiradora (Z') que comprende un grupo funcional para la conjugación a una Unidad de Ligando y capaz de (directa o indirectamente) conectar la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora a la Unidad de Ligando. Una Unidad de Ramificación está típicamente presente en formas de realización cuando se desea que se conjugué más de un fármaco a cada sitio de unión de la Unidad de Ligando. Una Unidad Conectora suele estar presente cuando se desea agregar más distancia entre la Unidad Estiradora y la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. En un aspecto, un Compuesto Enlazador de Fármaco tiene una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una Unidad de Fármaco con la estructura de Fórmula I, SI, I' o SI' como se define anteriormente en este documento.

En un aspecto, un compuesto de Fármaco-Enlazador se compone de una unidad de fármaco y una Unidad de Enlazadora, en el que esa unidad se compone de un resto auto-inmolador activable (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora unida directamente a una camilla Precursor de la unidad (Z') o indirectamente a Z' a través de la unión a componente(s) intermedio(s) de la Unidad Enlazadora del Compuesto de Fármaco-Enlazador (es decir, A y/o B), donde Z' está compuesto

por un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente a un ligando dirigido, y una Unidad de Fármaco que está unida directamente a una unidad de carbamato de metileno de la Unidad de Ensamblaje SI. En algunas formas de realización hay de 1 a 4 Unidades de ensamblaje SI en cada Unidad Enlazadora o resto enlazador de fármaco en cada sitio de unión a la Unidad de Ligando. En formas de realización en las que hay dos o más Unidades de Ensamblaje SI en una Unidad Enlazadora de un Compuesto Enlazador de Fármaco debido a la ramificación en la Unidad Enlazadora, una Unidad de Ramificación, B, (o su precursor B' cuando una Unidad de Ramificación se une directamente a la Unidad de Ligando), está presente para permitir tal ramificación. En esas formas de realización, un Ejemplo de Compuesto de Fármaco-Enlazador está representado por la Fórmula V a continuación:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables;
donde

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno indicada;

T* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno indicada;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

X es un resto auto-inmolador activable;

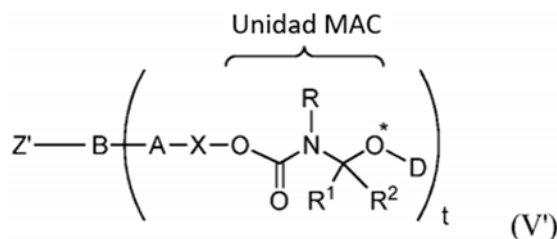
Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a Z;

B es una unidad de distribución opcional que está presente cuando el subíndice t es 2, 3 o 4 y está ausente cuando el subíndice t es 1;

A es una Unidad Conectora opcional; y

el subíndice t varía de 1 a 4.

En todos los aspectos, un Compuesto de Fármaco-Enlazador tiene la estructura de Fórmula V' como sigue:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo antes de su incorporación en la unidad de carbamato de alcoxi(ariloxi) de metileno (Unidad MAC) indicada, cuyo átomo de oxígeno se designa con O*;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

X es un resto auto-inmolador activable;

Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a Z;

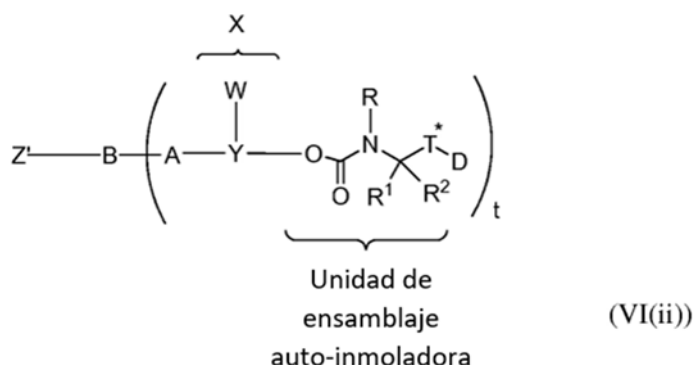
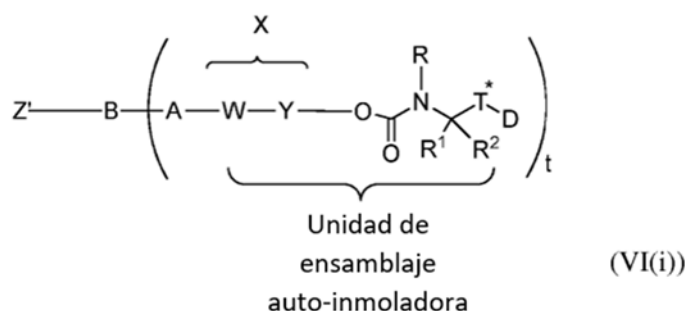
B es una unidad de distribución opcional que está presente cuando el subíndice t es 2, 3 o 4 y está ausente cuando el subíndice t es 1;

A es una Unidad Conectora opcional; y

el subíndice t varía de 1 a 4.

El grupo funcional hidroxilo al que se hace referencia con respecto a proporcionar una Unidad de Fármaco de un Compuesto Enlazador de Fármaco de Fórmula V' es el grupo funcional hidroxilo de un alcohol aromático o un alcohol alifático. El alcohol alifático puede ser un alcohol alifático primario, secundario o terciario. Preferiblemente, el alcohol es un alcohol alifático, más preferiblemente, un alcohol alifático primario o secundario.

La Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora está compuesta por un resto auto-inmolador activable (X) y una unidad de carbamato de metileno. En algunas formas de realización, ese resto activable está compuesto por una Unidad de Activación (W) y una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y). La Unidad de Activación inicia una secuencia de reacción de autoinmolación dentro de la Unidad Espaciadora, que da como resultado la liberación de fármaco libre del Compuesto Enlazador de Fármaco. La Unidad de Activación o la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora pueden formar el sitio de unión covalente al resto del Compuesto de Fármaco-Enlazador (es decir, a A, B o Z' dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B). En algunas formas de realización, un compuesto enlazador de fármaco consta de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora unida a una unidad de fármaco y se representa por la Fórmula VI(i) o VI(ii):



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde

A es una Unidad Conectora opcional;

W es una Unidad de Activación;

Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora;

Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a Z;

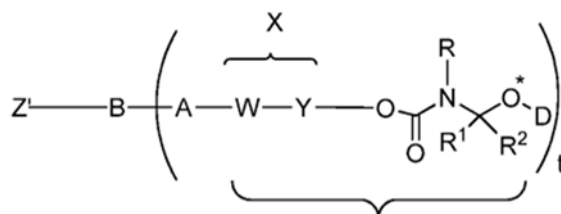
B es una Unidad de Ramificación opcional que está presente cuando el subíndice t es 2, 3 o 4, y está ausente cuando el subíndice t es 1;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo antes de su incorporación en la unidad de carbamato de alcoxi de metileno indicada;

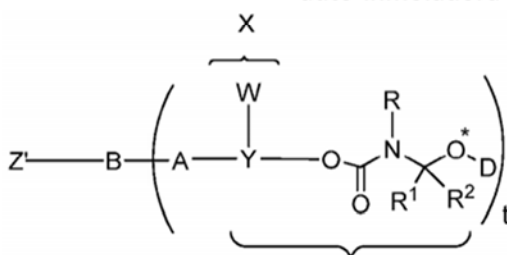
T* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad carbamato de metileno indicada; y el subíndice t varía de 1 a 4.

En algunas formas de realización, un Compuesto enlazador de fármaco se compone de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora unida a la Unidad de fármaco y se representa por la Fórmula VI (i)' o VI (ii)':



Unidad de
ensamblaje
auto-inmoladora

(VI (i)')



Unidad de
ensamblaje
auto-inmoladora

(VI (ii)')

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde

A es una Unidad Conectora opcional;

W es una Unidad de Activación;

Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora;

Z' es un precursor de una Unidad Estiradora (Z) y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a Z;

B es una Unidad de Ramificación opcional que está presente cuando el subíndice t es de 2 a 4 y está ausente cuando el subíndice t es 1;

R, R¹ y R² son hidrógeno;

D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo antes de su incorporación en la unidad de carbamato de alcoxi de metileno indicada;

T* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de alcoxi(ariloxi) de metileno indicada (Unidad MAC); y

el subíndice t es un número entero que oscila entre 1 y 4.

Las Fórmulas VI (i)' y VI (ii)' tienen una estructura MAC de Fórmula I'.

Como se indica, los compuestos de enlace de fármacos pueden actuar como compuestos intermedios para los LDC de la presente invención. En consecuencia, cualquiera de las formas de realización expuestas para los LDC es aplicable también para los Compuestos de Enlazador de Fármacos de la presente invención. En otras palabras, cualquiera de las definiciones para B, A, X, R, R¹, R², T*, D, O*, y los subíndices s y t y combinaciones de los mismos son aplicables y contemplados para los compuestos de enlace de fármacos de la presente invención.

Grupos de componentes

Unidades de ligando:

En algunas formas de realización de la invención, una Unidad de Ligando está presente, como por ejemplo en un Conjugado de ligando y fármaco. La Unidad de Ligando (L-) es un agente de direccionamiento que se une específicamente a un resto objetivo. En un grupo de formas de realización, la Unidad de Ligando se une específicamente y selectivamente a un componente celular (un agente de unión celular) o a otras moléculas diana de interés. La Unidad de Ligando actúa para dirigirse y presentar la Unidad de fármaco de un Conjugado de fármaco de ligando a la población de células objetivo particular con la que interactúa la Unidad de Ligando debido a la presencia de su componente o molécula objetivo y permite la liberación posterior de fármaco libre dentro (es decir, intracelularmente) o dentro de la vecindad de las células diana (es decir, extracelularmente). Los ligandos incluyen, pero no se limitan a proteínas, polipéptidos y péptidos. Las unidades de ligando adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, interferones, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como, entre otras, transferrina), o

cualquier otra molécula o sustancia de unión celular. En algunas formas de realización, la Unidad de Ligando es de un anticuerpo o un agente de direccionamiento de proteínas que no es un anticuerpo.

En un grupo de formas de realización, una Unidad de Ligando está unida a una Unidad Estiradora (Z). En algunas de esas formas de realización, la Unidad de Ligando está unida a Z de la Unidad Enlazadora a través de un heteroátomo de la Unidad de Ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una Unidad de Ligando para ese enlace incluyen azufre (en una forma de realización, de un grupo sulfhidrilo de un ligando dirigido), oxígeno (en una forma de realización, de un grupo carboxilo o hidroxilo de un ligando dirigido) y nitrógeno, opcionalmente sustituido (en una forma de realización, de un grupo funcional de amina primaria o secundaria de un ligando dirigido o en otra forma de realización de un nitrógeno de amida opcionalmente sustituido). Esos heteroátomos pueden estar presentes en el ligando dirigido en el estado natural del ligando, por ejemplo, en un anticuerpo natural, o pueden introducirse en el ligando dirigido mediante modificación química o ingeniería biológica.

En una forma de realización, una Unidad de Ligando tiene un grupo funcional sulfhidrilo de manera que la Unidad de Ligando se une a la Unidad Enlazadora a través del átomo de azufre del grupo funcional sulfhidrilo.

En otra forma de realización, una Unidad de Ligando tiene uno o más residuos de lisina que son capaces de reaccionar con ésteres activados (dichos ésteres incluyen, pero no se limitan a ésteres de N-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo y p-nitrofenilo) de un estirador. Precursor de la unidad de un compuesto intermedio de fármaco-enlazador y, por lo tanto, proporciona un enlace amida que consiste en el átomo de nitrógeno de la Unidad de Ligando y el grupo C=O de la Unidad Estiradora de la unidad de engarce.

En otro aspecto más, una Unidad de Ligando tiene uno o más residuos de lisina capaces de modificación química para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. En esas formas de realización, la Unidad de Ligando está unida a la Unidad de Enlazadora a través del átomo de azufre del grupo funcional sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar las lisinas de esa manera incluyen, pero no se limitan a S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivo de Traut).

En otra forma de realización, una Unidad de Ligando tiene uno o más grupos carbohidrato capaces de modificarse para proporcionar uno o más grupos funcionales sulfhidrilo. La Unidad de Ligando modificada químicamente en un Conjugado de Fármaco de Ligando está unida a un componente de Unidad Enlazadora (por ejemplo, una Unidad Estiradora) a través del átomo de azufre del grupo funcional sulfhidrilo.

En otra forma de realización más, una Unidad de Ligando tiene uno o más grupos de carbohidratos que pueden oxidarse para proporcionar un grupo funcional aldehído (-CHO) (ver, por ejemplo, Laguzza, et al., 1989, J. Med. Chem. 32(3):548-55). En esa forma de realización, el aldehído correspondiente interactúa con un sitio reactivo en un precursor de la Unidad Estiradora para formar un enlace entre la Unidad Estiradora y la Unidad de Ligando. Los sitios reactivos en un precursor de la Unidad Estiradora que pueden interactuar con un grupo funcional reactivo que contiene carbonilo en un ligando dirigido incluyen, pero no se limitan a hidracina e hidroxilamina. En Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002).

En algunos aspectos, una Unidad de Ligando es capaz de formar un enlace al interactuar con un grupo funcional reactivo en un precursor de la Unidad Estiradora (Z') para formar un enlace covalente entre la Unidad Estiradora (Z) y la Unidad de Ligando correspondiente al ligando objetivo. El grupo funcional de Z' que tiene esa capacidad para interactuar con un ligando dirigido dependerá de la naturaleza de la Unidad de Ligando. En algunas formas de realización, el grupo reactivo es una maleimida que está presente en una Unidad Estiradora antes de su unión para formar una Unidad de Ligando (es decir, un resto maleimida de un precursor de la Unidad Estiradora). La unión covalente de una Unidad de Ligando a una Unidad Estiradora se logra a través de un grupo funcional sulfhidrilo de una Unidad de Ligando que interactúa con el grupo funcional maleimida de Z' para formar una succinimida tio-sustituida. El grupo funcional sulfhidrilo puede estar presente en la Unidad de Ligando en el estado natural del Ligando, por ejemplo, en un residuo natural, o puede introducirse en el Ligando mediante modificación química o mediante ingeniería biológica.

En aún otra forma de realización, la Unidad de Ligando es de un anticuerpo y el grupo sulfhidrilo se genera por reducción de un disulfuro intercatenario del anticuerpo. En consecuencia, en algunas formas de realización, la Unidad Enlazadora se conjuga con un residuo de cisteína a partir de disulfuro(s) entre cadenas reducido(s).

En aún otra forma de realización, la Unidad de Ligando es de un anticuerpo y el grupo funcional sulfhidrilo se introduce químicamente en el anticuerpo, por ejemplo, mediante la introducción de un residuo de cisteína. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la Unidad Enlazadora se conjuga con una Unidad de Fármaco a través de un resto de cisteína introducido de una Unidad de Ligando.

Se ha observado para los bioconjugados que el sitio de conjugación del fármaco puede afectar a una serie de parámetros que incluyen la facilidad de conjugación, la estabilidad del enlazador del fármaco, los efectos sobre las propiedades biofísicas de los bioconjugados resultantes y la citotoxicidad in vitro. Con respecto a la estabilidad del enlazador de fármacos, el sitio de conjugación de un resto enlazador de fármacos a una Unidad de Ligando puede afectar la capacidad del resto enlazador de fármacos conjugado para experimentar una reacción de eliminación que provoque la liberación

prematura del fármaco libre y para el resto enlazador de fármacos que se transferirá del ligando de una LDC a un tiol reactivo alternativo presente en el medio de la LDC, como, por ejemplo, un tiol reactivo en albúmina, cisteína libre o glutatión presente en plasma. Los sitios para la conjugación en un ligando dirigido incluyen, por ejemplo, un disulfuro intercatenario reducido, así como un residuo de cisteína seleccionado en los sitios modificados. En algunas formas de realización, los métodos de conjugación para formar conjugados de ligando-fármaco como se describe en este documento usan residuos de tiol en sitios modificados genéticamente que son menos susceptibles a la reacción de eliminación (p. ej., posiciones 239 según el índice EU como se establece en Kabat) en comparación con los métodos de conjugación que usan residuos de tiol de un enlace disulfuro reducido. En otras formas de realización, los métodos de conjugación para formar conjugados de ligando-fármaco como se describe en el presente documento usan residuos de tiol en sitios que son más susceptibles a la reacción de eliminación (p. ej., como resultado de la reducción de disulfuro intercatenario).

Cuando un conjugado de ligando y fármaco se compone de una proteína, polipéptido o péptido no inmunorreactivo, su Unidad de Ligando, en lugar de ser de un anticuerpo, es de una proteína, polipéptido o péptido no inmunorreactivo que incluye, pero no se limita a transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformante ("TGF"), como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento similares a la insulina I y II, somatostatina, lectinas y apoproteínas de lipoproteínas de baja densidad.

Las Unidades de Ligando particularmente preferidas son de anticuerpos. De hecho, en cualquiera de las formas de realización descritas en el presente documento, la Unidad de Ligando puede ser de un anticuerpo. Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un determinante antigénico particular (p. ej., un antígeno de células cancerosas, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, una sustancia química, un ácido nucleico o fragmentos de los mismos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden fabricarse mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (p. ej., Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79 y Olsson y col., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a células diana (p. ej., antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos) u otros anticuerpos unidos a células tumorales o matriz. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de unirse inmunoespecíficamente a las células diana. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo central BIA) (véase, por ejemplo, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. Kabat E et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, entre otros, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, Fvs, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-FV o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Además, los anticuerpos recombinantes, como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que se pueden preparar utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como, por ejemplo, aquellos que tienen una región variable derivada de un monoclonal murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 4,816,567 y la Patente de EE. UU. N° 4,816,397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5,585,089). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando métodos descritos en la Publicación Internacional N° WO 87/02671; publicación de Patente Europea N° 0 184 187; publicación de Patente Europea N° 0 171 496; publicación de Patente Europea N° 0 173 494; Publicación Internacional N° WO 86/01533; Patente de los Estados Unidos N° 4,816,567; Publicación de Patente Europea N° 012 023; Berter y col., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 84:3439-3443; Liu y col., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 84:214-218; Nishimura y col., 1987, Cáncer. Res. 47:999-1005; Wood y col., 1985, Nature 314:446-449; y Shaw y col., 1988, J. Natl. Instituto de Cáncer 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Patente de EE. UU. N° 5,225,539; Jones y col., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeven y col., 1988, Science 239:1534; y Beidler y col., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos en algunos casos (p. ej., cuando puede ocurrir inmunogenicidad para un anticuerpo no humano o quimérico) son más deseables y se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que puede expresar genes humanos de cadenas pesadas y ligeras.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, pero sin limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, PEGilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas que incluyen, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos pueden tener modificaciones (p. ej., sustituciones, delecciones o adiciones) en los residuos de aminoácidos que interactúan con los receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en los residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (ver, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 97/34631).

Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa pueden obtenerse comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, como técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa puede obtenerse, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, publicaciones bibliográficas o mediante clonación y secuenciación de rutina.

En una forma de realización específica, se puede usar un anticuerpo conocido para el tratamiento del cáncer.

En otra forma de realización específica, los anticuerpos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune se usan de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o un complejo receptor expresado en un linfocito activado. El receptor o complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína de histocompatibilidad principal, una lectina o una proteína de control del complemento.

En algunos aspectos, el anticuerpo que se incorpora en un conjugado de fármaco ligando se unirá específicamente a CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, NTBA, alfa-v-beta-6, Liv-1 o Lewis Yantigen.

Unidades de fármaco (D):

La Unidad de Fármaco (D) puede ser de cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunosupresor (también denominado en el presente documento agente citotóxico, citostático o inmunosupresor), que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo átomo de oxígeno es capaz de incorporarse a una unidad de carbamato de metileno, y es capaz de liberarse de la unidad de carbamato de metileno como grupo funcional de un fármaco libre. En algunos aspectos, ese grupo funcional proporciona el único sitio en un fármaco disponible para unirlo a ese componente de la Unidad Enlazadora. El resto enlazador de fármaco resultante es uno que puede liberar fármaco libre activo de una LDC que tiene ese resto en el sitio objetivo de su Unidad de Ligando para ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor.

"Fármaco libre" se refiere al fármaco, tal como existe una vez liberado del resto enlazador de fármaco. El fármaco libre se diferencia del fármaco conjugado en que el grupo funcional del fármaco para unirse a la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora ya no está asociado con los componentes del conjugado ligando-fármaco (que no sea un heteroátomo previamente compartido). Por ejemplo, el grupo funcional hidroxilo libre de un fármaco que contiene alcohol se puede representar como D-O*H, mientras que en la forma conjugada el heteroátomo de oxígeno designado por O* se incorpora a la unidad de carbamato de metileno de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. Tras la activación del resto auto-inmolador y la liberación del fármaco libre, el enlace covalente con O* se reemplaza por un átomo de hidrógeno, de modo que el heteroátomo de oxígeno designado por O* está presente en el fármaco libre como -OH. En otro ejemplo, O* proviene de un grupo funcional hidroxilo libre de un precursor de un fármaco que contiene alcohol, que se representa como D'-O*H. Después de que el O* de ese precursor se incorpora a una unidad de carbamato de metileno de una Unidad de Asamblea inmoladora D'-O*- ese resto en la Unidad de Asamblea Auto-inmoladora se convierte posteriormente en DO*.

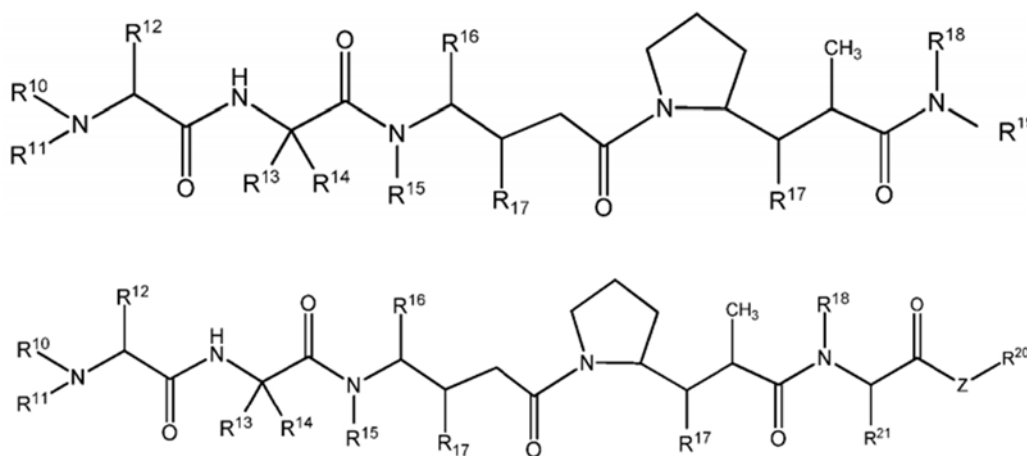
Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores que tienen un grupo funcional hidroxilo, o que pueden modificarse para tener dicho grupo funcional sin incurrir en una pérdida inaceptable de actividad biológica, que son adecuados para unirse a una unidad de carbamato de metileno incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, ADN aglutinantes del surco menor, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de la quimioterapia, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares. Ejemplos de clases particularmente útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, ligantes del surco menor de ADN,

agentes alquilantes de ADN e inhibidores de tubulina. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinas y maitansinoides, taxanos, benzodiazepinas o fármacos que contienen benzodiazepinas (p. ej., pirrolo[1,4]-benzodiazepinas (PBD), indolinobenzodiazepinas y oxazolidinobenzodiazepinas) y alcaloides de la vinca.

En algunas formas de realización, la Unidad de Fármaco es de un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero no se limitan a taxanos, alcaloides de la vinca maitansina y maitansinoides, dolastatinas y auristatinas.

En ciertas formas de realización, el agente citotóxico es de maitansina o un maitansinoide.

En algunas formas de realización, la Unidad de Fármaco es de una auristatina que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo átomo de oxígeno se incorpora a una Unidad MAC. Los ejemplos de auristatinas preferidas incluyen compuestos que tienen una de las siguientes estructuras:



donde R^{10} y R^{11} son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_8 ; R^{12} es hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(cicloalquilo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 o $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8); R^{13} es hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(cicloalquilo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8); R^{14} es hidrógeno o metilo, o R^{13} y R^{14} tomados junto con el carbono al que están unidos comprenden un cicloalquilo C_3-C_8 ; R^{15} es hidrógeno o alquilo C_1-C_8 ; R^{16} es hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(cicloalquilo C_3-C_8), heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8); R^{17} son independientemente hidrógeno, $-OH$, alquilo C_1-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 y o $-(alquilo C_1-C_8)$; R^{18} es hidrógeno o alquilo C_1-C_8 ; R^{19} es $-C(R^{19A})_2-C(R^{19A})_2$ -arilo, $-C(R^{19A})_2-C(R^{19A})_2$ -(heterociclo C_3-C_8) o $-C(R^{19A})_2-C(R^{19A})_2$ -(C_3-C_8 cicloalquilo), donde cada R^{19A} es independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_8 , $-OH$ o $-O$ -alquilo C_1-C_8 , siempre que al menos un R^{19A} es $-OH$; R^{20} es hidroxialquilo, que incluye $-CH(CH_3)-OH$; Z es O , S , NH y X^1 es alquilenos C_1-C_{10} .

Las síntesis y estructuras de auristatinas que tienen un grupo funcional hidroxilo cuyo átomo de oxígeno puede incorporarse en una unidad MAC se describen en las publicaciones de solicitud de Patente de EE. UU. N^{os} 2003-0083263, 2005-0238649 2005-0009751, 2009-0111756 y 2011-0020343; Publicación de Patente Internacional N^o WO 04/010957, Publicación de Patente Internacional N^o WO 02/088172, y Patentes de EE. UU. N^{os} 7,659,241 y 8,343,928; las auristatinas ejemplares que contienen alcohol liberadas de los LDC de la presente invención se unen a la tubulina y ejercen un efecto citotóxico o citostático sobre las células deseadas (es decir, células diana) como resultado de esa unión.

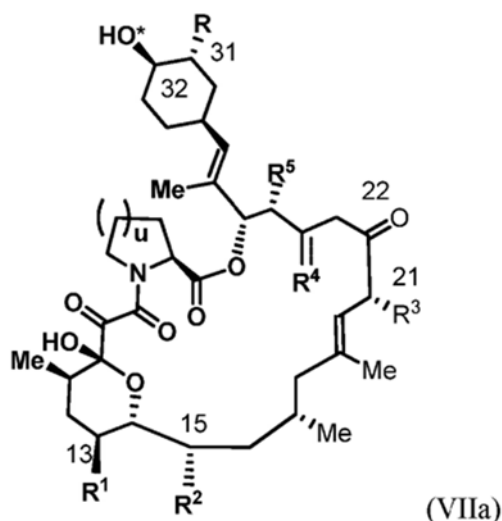
Las auristatinas más preferidas que tienen un grupo funcional hidroxilo cuyo heteroátomo se incorpora a una Unidad MAC es monometil auristatina E y auristatina T.

En algunas formas de realización, la Unidad de Medicamentos es de una benzodiazepina (incluidos los medicamentos que contienen benzodiazepinas (p.ej., pirrolo[1,4]benzodiazepinas (PBD), indolinobenzodiazepinas y oxazolidinobenzodiazepinas) que tienen o están modificados para tener un grupo funcional hidroxilo, amina, amida o tiol adecuado para su incorporación en una unidad de fármaco unida covalentemente a una unidad de carbamato de metileno a través de un heteroátomo de ese grupo funcional.

En otros aspectos, la Unidad de Fármaco es una inmunofilina de la clase FKBP (como se describe en Wiederrecht y Etzhorn "Immunophilins" Perspec. Drug Discov. Des. (1994) 2(1): 57-84), denominada en el presente documento inmunofilina FKBP, que tiene un grupo funcional hidroxilo adecuado para la incorporación en una Unidad de fármaco unida covalentemente a una Unidad MAC a través del átomo de oxígeno de ese grupo funcional.

En las formas de realización, la inmunofilina adecuada para la incorporación en una unidad de fármaco unida covalentemente a una unidad MAC se une a FKBP-12 como fármaco libre para inhibir la función efectora de la calcineurina necesaria para la proliferación de células T. En una forma de realización, la inmunofilina FKBP que es capaz de incorporarse en una Unidad MAC y como fármaco libre se une a FKBP-12 para inhibir la función efectora de la calcineurina

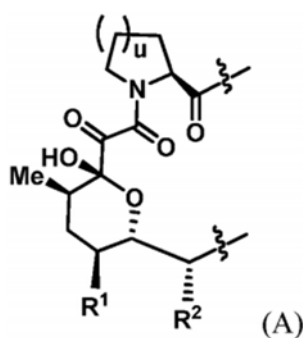
tiene la estructura general de Fórmula VIIa



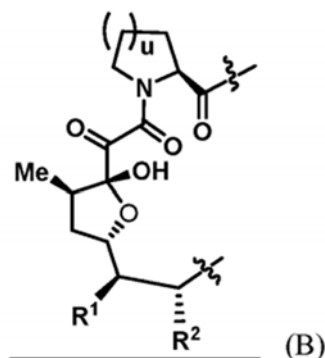
en el que el subíndice u es 0 o 1 para definir un resto de ácido pipecólico o prolínico, en el que R, R¹ y R² son independientemente -OH, un C opcionalmente sustituido éter C₁-C₆ o un éster C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente R, R¹ y R² son -OMe); R³ es alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido (preferiblemente metilo, etilo, -CH₂CH=CH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃; R⁴ es oxo (es decir, =O), o -OH o éster C₁-C₆ en la configuración α o β (preferiblemente =O o α-OH) y R⁵ es hidrógeno o alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido (preferiblemente hidrógeno o metilo).

En formas de realización de Fórmula VIIa, el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe; R³ es etilo; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe; R³ es metilo; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 1; R, R¹ y R² son -OMe; R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe; R³ es etilo, R⁴ es α-OH y R⁵ es hidrógeno, o el subíndice u es 1; R, R¹ y R² son -OMe; R³ es etilo, R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 2; R es -OMe; R¹ es -OH; R² es metilo, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo.

En otras formas de realización, el resto A en la Fórmula VIIa de

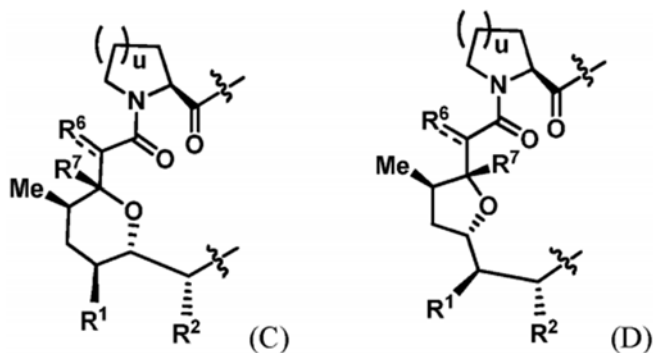


se reemplaza por el resto B



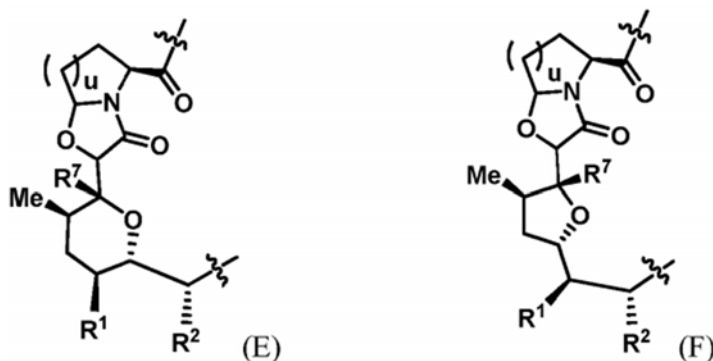
para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIb, donde las líneas onduladas indican unión covalente al resto del macrólido; el subíndice u, R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son como se define en la Fórmula VIIa. En formas de realización preferidas de Fórmula VIIb, el subíndice u es 2, R es -OMe; R¹ es -OH; R² es -OMe; R³ es metilo, etilo o -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es hidrógeno o metilo.

En otras formas de realización, el resto A en la Fórmula VIIa se reemplaza por el resto de C o D



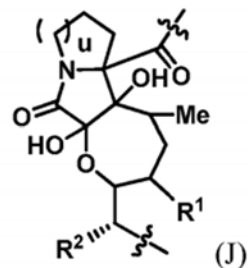
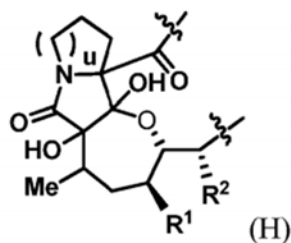
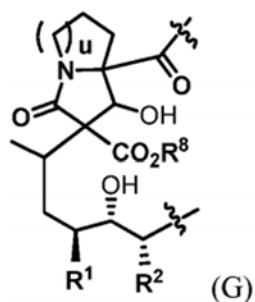
para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIc o VIId, respectivamente, en las que R⁶ es hidrógeno, oxo (es decir, =O), -OH en la configuración α o β, epóxido (es decir, -CH₂O-), =N(R⁶) o =C(R⁶)₂; R₇ es -OH o -N(R⁶)₂; y el subíndice u, R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son como se define en la Fórmula VIIa, en la que en cada aparición R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y C₁-C₄ opcionalmente sustituido alquilo

En otras formas de realización, el resto A en la Fórmula VIIa se reemplaza por el resto E o F



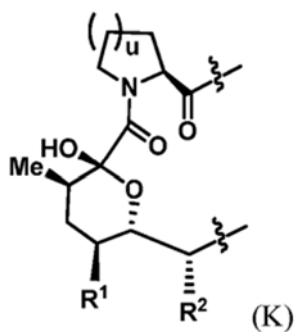
para definir las inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIe o VIIf, respectivamente, en las que el subíndice u, R, R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ son como se definen en la Fórmula VIIa y R₇ es como se define en la Fórmula VIIc/VIId. Preferiblemente en la Fórmula VIIe, R, R¹ y R² son -OMe; R³ es metilo, etilo o -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es hidrógeno o metilo; y R₇ es -OH, y preferiblemente en la Fórmula VIIf, el subíndice u es 2, R es -OMe, R¹ es -OH; R² es -OMe; R³ es metilo, etilo o -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es hidrógeno o metilo; y R₇ es -OH.

En otras formas de realización, el resto de Fórmula A en la Fórmula VIIa se reemplaza por el resto G, H o J



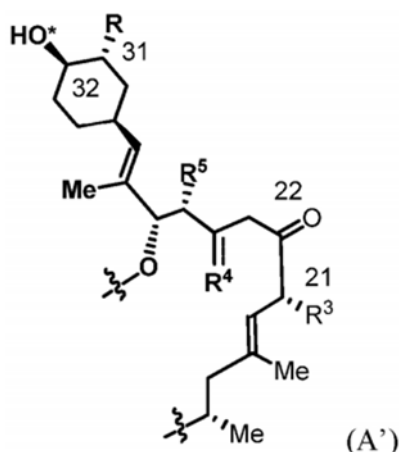
para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIg, VIIh y VIIj, respectivamente, en las que R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son como se define en la Fórmula VIIa; y R^8 es hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido. Preferiblemente en esas Fórmulas el subíndice u es 2; R , R^1 y R^2 son -OMe; R^3 es metilo, etilo o $-CH_2CH=CH_2$; R^4 es α -OH; R^5 es hidrógeno o metilo; y R^8 es metilo o etilo.

En otras formas de realización, el resto A en la Fórmula VIIa se reemplaza por el resto K

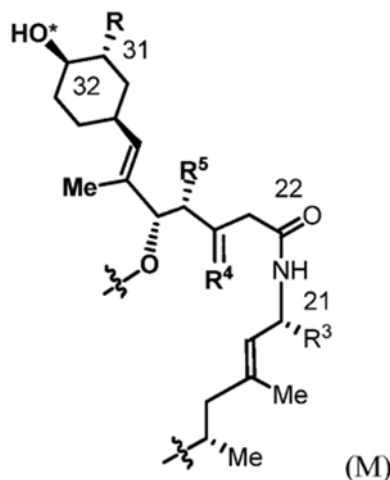


para definir las inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIk, en las que los subíndices u , R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se definen en la Fórmula VIIa.

En otras formas de realización, el resto A' en la Fórmula VIIa, VIIb, VIIc, VIId, VIle, VIIf, VIIg, VIIh, VIIj o VIIk se reemplaza por el resto,

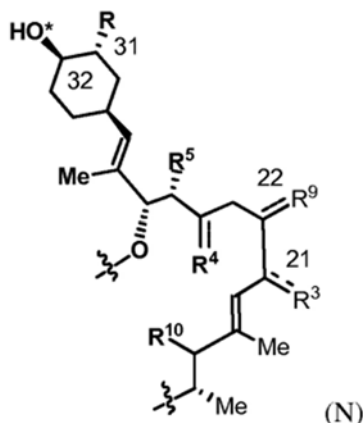


se reemplaza por el resto M



para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIm(i), VIIm(ii), VIIm(iii), VIIm(iv), VIIm(v), VIIm(vi), VIIm(vii), VIIm(viii), VIIm(ix) y VIIm(x), respectivamente, en donde los grupos variables son como se definen en su correspondiente estructura principal. Un reemplazo preferido de A' con el resto M es para la Fórmula VIa que define inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIm(i), en la que R, R¹ y R² son -OMe; R³ es metilo, etilo o -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es hidrógeno o metilo.

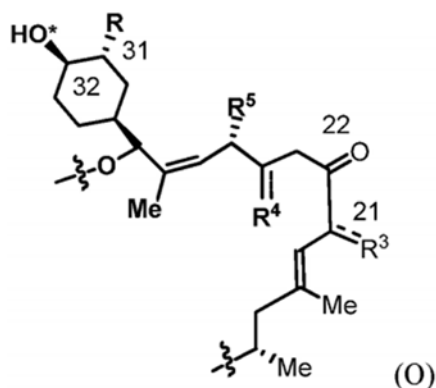
En otras formas de realización, el resto A' en la Fórmula VIIa, VIIb, VIIc, VIId, VIle, VIIf, VIlg, VIIh, VIIj o VIIk se reemplaza por el resto N



para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIn(i), VIIn(ii), VIIn(iii), VIIn(iv), VIIn(v), VIIn(vi), VIIn(vii), VIIn(viii), VIIn(ix) y VIIn(x), en los que R³ es R^{3A}, R^{3B} (es decir, C-21 está unido a R^{3A} y R^{3B}), donde R^{3A} en la configuración α es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente metilo, etilo, -CH₂CH=CH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃) y R^{3B} en la configuración β es hidrógeno o -OH, o R^{3A} en la configuración α es -OH y R^{3B} en la configuración β es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente metilo, etilo, -CH₂CH=CH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃); R⁹ es oxo o -OH en la configuración α o β; y R¹⁰ es hidrógeno o flúor en la configuración α o β, siempre que cuando R^{3B} sea hidrógeno y R⁹ sea oxo, entonces R¹⁰ no sea hidrógeno; y los grupos de variables restantes son como se definen en su estructura principal correspondiente.

Un reemplazo preferido de A' con el resto N es para la Fórmula VIa que define inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIn(i), en la que R, R¹ y R² son -OMe; R^{3A} es metilo o etilo y R^{3B} es hidrógeno; R⁴ es α-OH; R⁵ es hidrógeno o metilo; R⁹ es oxo; y R¹⁰ es flúor en la configuración α o β. R, R¹ y R² son -OMe; R^{3A} es metilo o etilo y R^{3B} es -OH o R^{3A} es -OH y R^{3B} es metilo o etilo; R⁴ es α-OH; R⁵ es hidrógeno o metilo; R⁹ es oxo; y R¹⁰ es hidrógeno o -OH en la configuración α o β.

En otras formas de realización, el resto A' en la Fórmula VIIa, VIIb, VIIc, VIId, VIle, VIIf, VIlg, VIIh, VIIj o VIIk se reemplaza por el resto O



para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula Vlo(i), Vlo(ii), Vlo(iii), Vlo(iv), Vlo(v), Vlo(vi), Vlo(vii), Vlo(viii), Vlo(ix) y Vlo(x), respectivamente, donde R, R³, R⁴ y R⁵ son como se definen para las inmunofilinas VIn y los grupos variables restantes son como se define en su correspondiente estructura matriz.

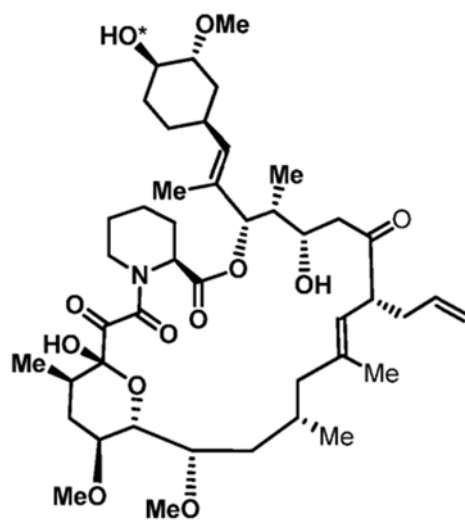
Un reemplazo A' preferido con el resto O es para la Fórmula VIa que define inmunofilinas FKBP de Fórmula VIlo(i), en la que R, R¹ y R² son -OMe; R^{3A} en la configuración α es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente metilo, etilo, -CH₂CH=CH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃); R^{3B} en la configuración β es hidrógeno; R⁴ es α -OH; R⁵ es hidrógeno o metilo.

En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIa, u es 2; R, R¹ y R² son -OMe, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo, o el subíndice u es 2; R es -OMe; R¹ es -OH; R² es metilo, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIb, u es 2; R es -OMe; R¹ es -OH; R² es metilo, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIc, el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; R⁶ es hidrógeno, =CH₂, o -OH en la configuración α o β (preferiblemente -OH); y R₇ es -OH. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIId, el subíndice u es 2; R es -OMe; R¹ es -OH; R² es metilo, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; R⁶ es hidrógeno, =CH₂, o -OH en la configuración α o β (preferiblemente -OH); y R₇ es -OH. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIle, R, R¹ y R² son -OMe; R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; y R₇ es -OH.

En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIf, el subíndice u es 2, R es -OMe, R¹ es -OH; R² es -OMe; R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; y R₇ es -OH. En formas de realización más preferidas de VIIf, VIIh o VIIj, R, R¹ y R² son -OMe; R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; y R⁸ es metilo. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIk o Fórmula VIIm(i), el subíndice u es 2; R, R¹ y R² son -OMe, R³ es -CH₂CH=CH₂; R⁴ es α-OH. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIn(i), R, R¹ y R² son -OMe; R³ es etilo; R⁴ es α-OH; R⁵ es metilo; R⁹ es oxo; y R¹⁰ es -OH en la configuración α o β. En formas de realización más preferidas de Fórmula VIIo(i), R, R¹ y R² son -OMe; R^{3A} en la configuración α es -CH₂CH=CH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃; R^{3B} en la configuración β es hidrógeno; R⁴ es α-OH; y R⁵ es metilo.

En otras formas de realización más preferidas, la Unidad de Fármaco en cualquiera de las Fórmulas I, I', II y II' es de la inmunofilina FKBP de Fórmula VIIa, VIIb, VIIc, VIId, VIIe, VIIf, VIIfg, VIIh, VIIj, VIIm(i), VIIm(ii), VIIm(iii), VIIm(iv), VIIm(v), VIIm(vi), VIIm(vii), VIIm(viii), VIIm(ix), VIIm(x), VIIn(i), VIIn(ii), VIIn(iii), VIIn(iv), VIIn(v), VIIn(vi), VIIn(vii), VIIn(viii), VIIn(ix), VIIo(i), VIIo(ii), VIIo(iii), VIIo(iv), VIIo(v), VIIo(vi), VIIo(vii), VIIo(viii), VIIo(ix) y VIIo(x), en las que el heteroátomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo en la posición C-32 en cualquiera de estas inmunofilinas FKBP está representado por O* o T* en la Fórmula I, I' o II'.

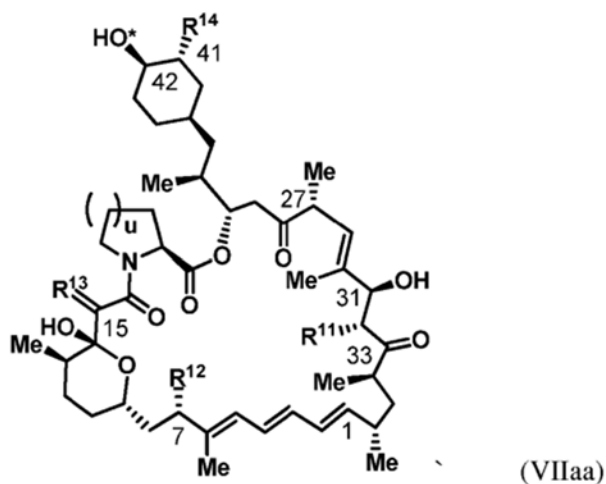
En formas de realización particularmente preferidas, la Unidad de Fármaco en cualquiera de las Fórmulas I, I', II y II', es de la inmunofilina FKBP tacrólimus (FK-506), cuya estructura es la siguiente:



donde el O* indicado es el heteroátomo O* o T* que se incorpora a una unidad de carbamato de metileno en cualquiera de estas Fórmulas, o es de otro macrólido inhibidor de la función efectora de calcineurina que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo átomo de oxígeno es capaz de incorporarse en una Unidad MAC o es de otro macrólido inhibidor de la función efectora de calcineurina que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo heterooxígeno es capaz de incorporarse en una Unidad MAC. El heteroátomo del grupo funcional hidroxilo incorporado en una Unidad MAC se indica con O* para tacrólimus.

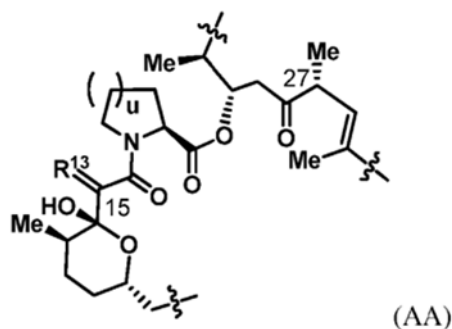
En otro grupo de formas de realización, la inmunofilina adecuada para la incorporación en una unidad de fármaco unida covalentemente a una unidad MAC se une a FKBP-12 como el fármaco libre para inhibir la función efectora de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) requerida para aumentar la síntesis de proteínas para apoyar la proliferación y supervivencia de las células cancerosas.

En una forma de realización, la inmunofilina FKBP que es capaz de incorporarse en una unidad MAC y como fármaco libre se une a FKBP-12 para inhibir la función efectora de mTOR tiene la estructura general de Fórmula VIIaa

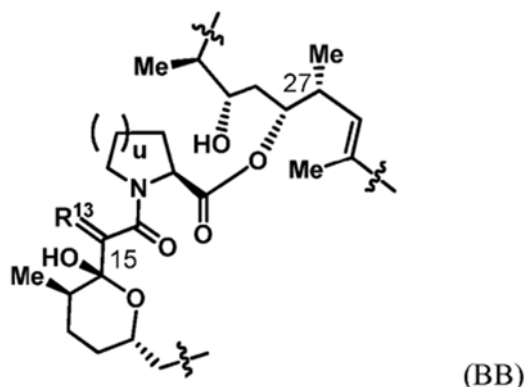


en la que u es 1 o 2 para definir un resto de ácido pipecólico o prolilino; R¹⁴ y R¹² son independientemente, -OH, un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido o un éster C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente -OH o un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido; más preferiblemente -OH o -OCH₃); R¹¹ es hidrógeno, -OH, un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido o un éster C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente hidrógeno, -OH o un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido; más preferiblemente hidrógeno, -OH o -OCH₃); y R¹³ es O (es decir, define =O en C₁₅) o CH₂ (es decir, define =CH₂ en C₁₅).

En otras formas de realización, el resto AA en la Fórmula VIIaa de

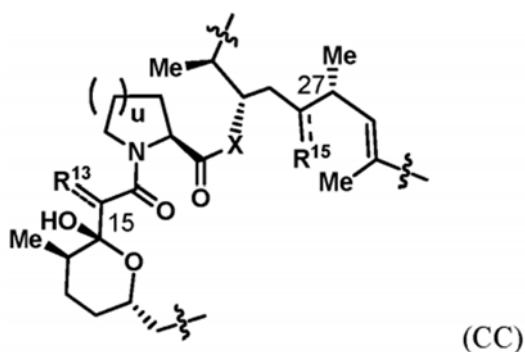


se reemplaza con el resto de Fórmula BB



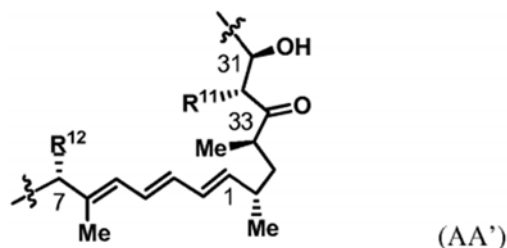
para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIbb, en donde los subíndices u, R, R¹¹, R¹² y R¹³ son como se definen para la Fórmula VIIaa. En formas de realización preferidas de Fórmula VIIaa, el subíndice u es 2; R_y R¹² son independientemente -OH o un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido (más preferiblemente -OH o -OCH₃); R¹¹ es hidrógeno, -OH o un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido (más preferiblemente hidrógeno, -OH o -OCH₃); y R¹³ es O (es decir, define =O en C-15) o CH₂ (es decir, define =CH₂ en C-15) (más preferiblemente, R¹³ es O).

En otras formas de realización, el resto AA se reemplaza por el resto de Fórmula CC

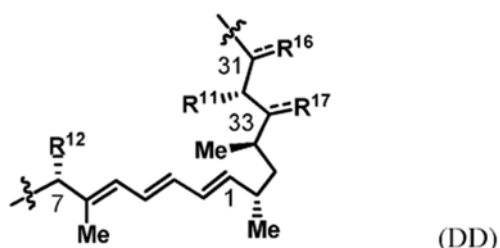


para definir inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIcc, en las que u es 1 o 2; X es O u OCH₂CH₂S-; R¹³ es O, NOR¹³, (es decir, define una oxima en C15) o NHNHR^{13'} (es decir, define una hidrazona en C15), donde R^{13'} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido; R¹³ es R^{13A}, R^{13B} (es decir, C-15 está unido a R^{13A} y R^{13B}), donde R^{13A} en la configuración α es hidrógeno y R^{13B} en la configuración β es -OH o R^{13A} en la configuración α es -OH y R^{13B} en la configuración β es hidrógeno; R¹⁵ es O o R¹⁵ es R^{15A}, R^{15B} (es decir, C-15 está unido a R^{15A} y R^{15B}), donde R^{15A} en la configuración α es hidrógeno y R^{15B} en la configuración β es -OH o R^{15A} en la configuración α es -OH y R^{15B} en la configuración β es hidrógeno.

En otras formas de realización, el resto AA' en la Fórmula VIIaa, VIIbb o VIIcc de

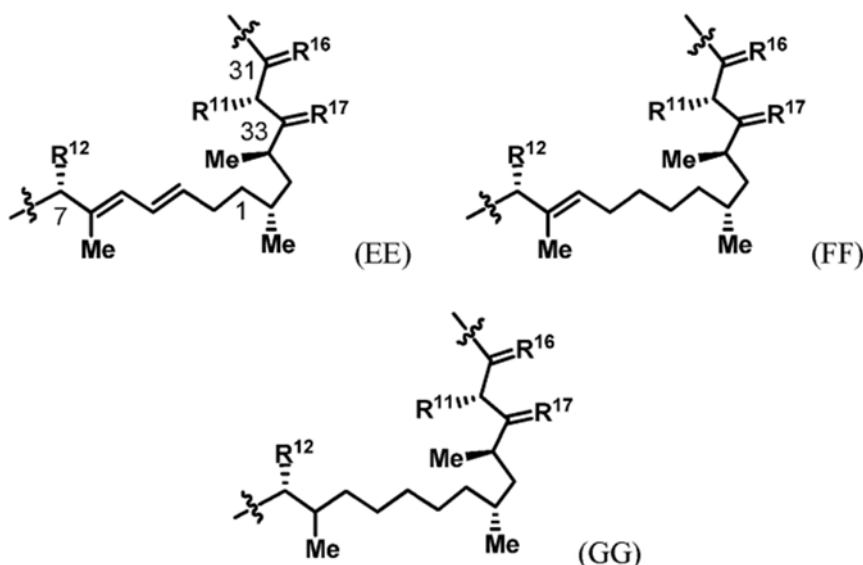


se reemplaza por el resto de Fórmula DD



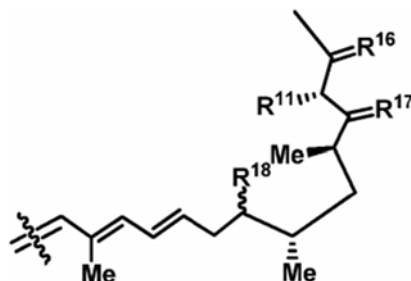
para inmunofilinas FKBP definidas de Fórmula VIId(i), VIId(ii) y VIId(iii), respectivamente, en donde R^{11} y R^{12} son como se definen en la Fórmula VIIaa, R^{16} es O (es decir, para definir =O en C-31) o R^{16} es R^{16A} , R^{16B} (es decir, C-31 está unido a R^{16A} y R^{16B}), donde R^{16A} en la configuración α es hidrógeno y R^{16B} en la configuración β es -OH o R^{16A} en la configuración α es -OH y R^{16B} en la configuración β es hidrógeno; R^{17} es O (es decir, para definir =O en C-33) o R^{17} es R^{17A} , R^{17B} (es decir, C-33 está unido a R^{17A} y R^{17B}), donde R^{17A} en la configuración α es hidrógeno y R^{17B} en la configuración β es -OH, un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente -OR^{17B'}) o un carbamato con enlace O opcionalmente sustituido (preferiblemente -O(C=O)NHR^{17B'}) o R^{17A} en la configuración α es -OH, un éter C₁-C₆ opcionalmente sustituido (preferiblemente -OR^{17A'}) o un carbamato unido a O opcionalmente sustituido (preferiblemente -O(C=O)NHR^{17B'}) y R^{17B} en la configuración β es hidrógeno, donde $R^{17A'}$ y $R^{17B'}$ son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₄ (preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo), o R^{16} y R^{17} son N (para definir =N en C-31 y C-32) y junto con el carbono C-32 y C-32 al que están unidos definen un heterociclo de pirazol; y los grupos de variables restantes son como se definen en su estructura principal correspondiente.

En otras formas de realización, el resto AA' en la Fórmula VIIaa, VIIbb o VIIcc se reemplaza por el resto de Fórmula EE, FF o GG



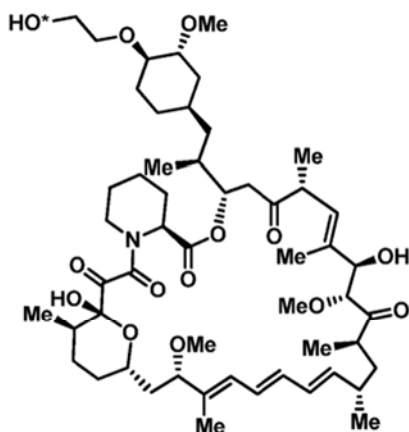
para definir a partir de la Fórmula EE, inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIee(i), VIIee(ii) y VIIee(iii), respectivamente, de Fórmula FF, inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIff(i), VIIff(ii) y VIIff(iii), respectivamente o de Fórmula GG, inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIff(i), VIIff(ii) y VIIff(iii), en donde R^{11} y R^{12} son como se definen en la Fórmula VIIaa; R^{16} y R^{17} son como se definen en la Fórmula DD y los grupos de variables restantes son como se definen por su estructura principal respectiva.

En otras formas de realización, el resto AA' en la Fórmula VIIaa, VIIbb o VIIcc se reemplaza por el resto de Fórmula HH o JJ

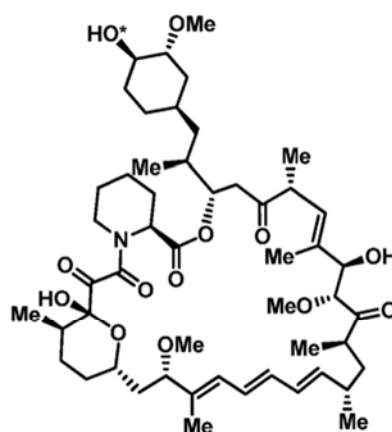


para definir a partir de la Fórmula HH, inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIhh(i), VIIhh(ii) y VIIhh(iii)), respectivamente, o de Fórmula JJ, inmunofilinas FKBP de Fórmula VIIjj(i), VIIjj(ii) y VIIjj(iii), respectivamente.

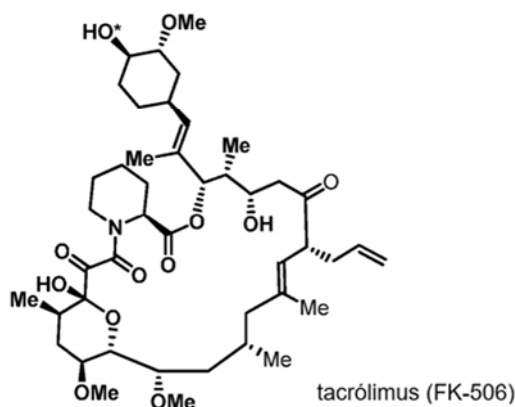
En formas de realización particularmente preferidas, la unidad de fármaco en cualquiera de las Fórmulas I, I', II y II' es de la inmunofilina FKBP, everolimus, sirolimus (rapamicina) u otro inhibidor macrolídico de la función efectora de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR). que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo heteroátomo de oxígeno es capaz de incorporarse en una unidad MAC. El heteroátomo del grupo funcional hidroxilo incorporado en una unidad MAC se indica mediante O* para tacrólimus, everolimus y sirolimus en las siguientes estructuras.



Everólimus



Sirólimus (rapamicina)



tacrólimus (FK-506)

En algunos aspectos, una Unidad de Fármaco es un fármaco que contiene alcohol en el que el grupo funcional hidroxilo del alcohol se incorpora a la unidad de carbamato de metileno de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora a través del átomo de oxígeno de ese grupo funcional. En algunos de estos aspectos, el alcohol de la droga es un alcohol alifático (por ejemplo, un alcohol primario, secundario o terciario). En otros aspectos similares, la droga es un alcohol aromático.

Hay varios ensayos diferentes que pueden usarse para determinar si un conjugado de ligando-fármaco ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular. En un ejemplo para determinar si un conjugado de ligando-fármaco ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular, se usa un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células a una densidad de 5000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos se cultivan durante un período de 72 horas y se exponen a 0,5 μCi de ^3H -timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas, y la incorporación de ^3H -timidina en las células del cultivo se mide en presencia y ausencia del Conjugado Ligando-Fármaco. El Conjugado Ligando-Fármaco tiene un efecto citostático o citotóxico en la línea celular si las células del cultivo han reducido la incorporación de ^3H -timidina en comparación con las células de la misma línea celular cultivadas en las mismas condiciones, pero no en contacto con el Conjugado Ligando-Fármaco.

En otro ejemplo, para determinar si un conjugado de ligando-fármaco ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular, la viabilidad celular se mide determinando en una célula la captación de un colorante como rojo neutro, azul de tripano o azul ALAMARTM (véase, por ejemplo, Page y col., 1993, Intl. J. of Oncology 3:473 - 476). En tal ensayo, las células se incuban en medios que contienen el tinte, se lavan las células y el tinte restante, que refleja la captación celular del tinte, se mide espectrofotométricamente. El colorante de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) también puede usarse para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). Los conjugados de fármaco-ligando preferidos incluyen aquellos con un valor CI_{50} (definido como la concentración de mAb que da un 50 % de muerte celular) de menos de 1000 ng/ml, preferiblemente menos de 500 ng/ml, más preferiblemente menos de 100 ng/ml, incluso lo más preferiblemente menos de 50 o incluso menos de 10 ng/ml en la línea celular.

Los procedimientos generales para unir un fármaco a un resto enlazador para proporcionar un compuesto de fármaco enlazador y conjugar dichos compuestos con un resto ligando para proporcionar un conjugado de fármaco enlazador son conocidos en la técnica y se pueden usar en combinación con los métodos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N^{os} 8,163,888, 7,659,241, 7,498,298, la Publicación de EE. UU. N^o US20110256157 y las Solicitudes Internacionales N^{os} WO2011023883 y WO2005112919.

Unidad de extensión (Z) o (Z'):

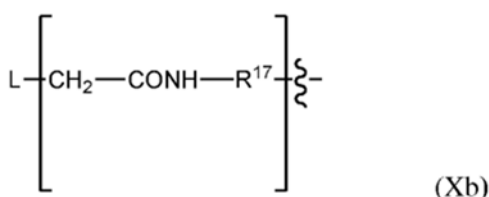
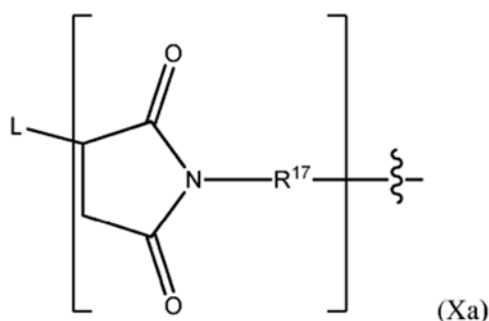
Una Unidad Estiradora (Z) es un componente de un LDC o un Compuesto enlazador de fármaco u otro intermedio que actúa para conectar la Unidad de Ligando a la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. En ese sentido, una Unidad Estiradora, antes de la unión a una Unidad de Ligando (es decir, un precursor de la Unidad Estiradora, Z'), tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de un ligando dirigido. En los aspectos en los que hay ramificación dentro de la Unidad Enlazadora, la unión a la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es a través de una Unidad de Ramificación, B (opcionalmente a través de una Unidad Conectora intermedia, A). En aquellos aspectos en los que se desee prever más distancia entre la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora y la Unidad Estiradora, la unión de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora a B o Z, según la presencia o ausencia de B, puede ser a través de una Unidad Conectora (A).

En algunos aspectos, un precursor de la Unidad Estiradora (Z') tiene un grupo electrofílico que es capaz de interactuar con un grupo nucleofílico reactivo presente en una Unidad de Ligando (por ejemplo, un anticuerpo) para proporcionar un enlace covalente entre una Unidad de Ligando y la Unidad Estiradora de una Unidad Enlazadora. Los grupos nucleófilos en un anticuerpo que tiene esa capacidad incluyen, entre otros, grupos funcionales sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleofílico de un anticuerpo es reactivo con un grupo electrofílico en un precursor de la Unidad Estiradora y proporciona un enlace covalente entre la Unidad de Ligando y la Unidad Estiradora de una Unidad Enlazadora o un resto fármaco-enlazador. Los grupos electrofílicos útiles para ese propósito incluyen, pero son sin limitación, maleimida, grupos haloacetamida y ésteres de NHS. El grupo electrofílico proporciona un sitio conveniente para la unión de anticuerpos para formar un intermediario LDC o Ligando-Enlazador.

En otra forma de realización, un precursor de la Unidad Estiradora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleofílico que es reactivo con un grupo electrofílico presente en una Unidad de Ligando (p. ej., un anticuerpo). Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo para ese propósito incluyen, pero no se limitan a grupos carbonilo aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un precursor de la Unidad Estiradora puede reaccionar con un grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleofílicos útiles en un precursor de la Unidad Estiradora para ese propósito incluyen, pero no se limitan a hidrazida, hidroxilamina, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión del anticuerpo para formar un intermediario LDC o Ligando-Enlazador.

En algunas formas de realización, un átomo de azufre de una Unidad de Ligando se une a un sistema de anillo de succinimida de una Unidad Estiradora formado por reacción de un grupo funcional tiol de un ligando dirigido con un resto maleimida del precursor correspondiente de la Unidad Estiradora. En otras formas de realización, un grupo funcional tiol de una Unidad de Ligando reacciona con un resto de alfa haloacetamida para proporcionar una Unidad Estiradora con enlaces de azufre mediante el desplazamiento nucleofílico de su sustituyente halógeno.

Las Unidades Estiradoras representativas de esas formas de realización incluyen aquellas dentro de los corchetes de las Fórmulas Xa y Xb:



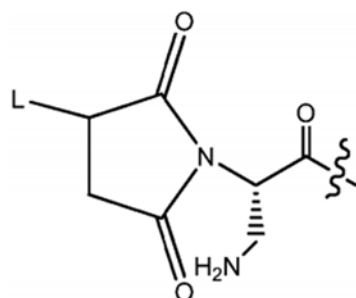
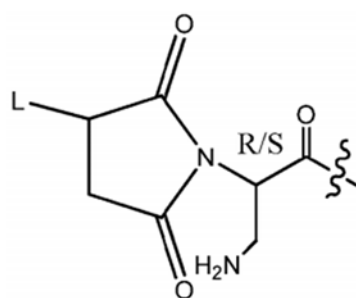
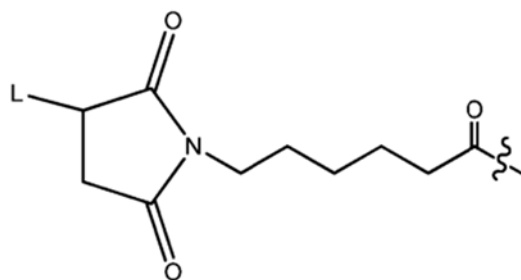
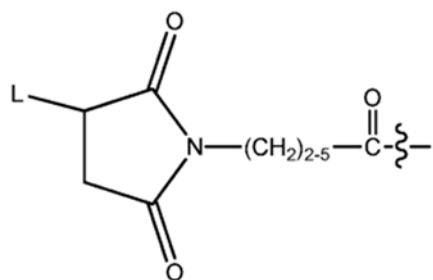
donde la línea ondulada indica unión a la Unidad de Ramificación (B) o la Unidad Conectora (A) si B está ausente o la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (X), si A y B están ausentes y R^{17} es -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-, -arileno-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -C(=O)-, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-C(=O)-, -arileno-C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-C(=O)-, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-C(=O)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-C(=O)-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -NH-, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -NH-, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -NH-, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-NH-, -arileno-NH-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-NH-, -arilenoalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -NH-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-NH-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -NH-, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -NH-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-NH-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -NH-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -S-, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -S-, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -S-, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-S-, -arileno-S-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-S-, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -S-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-S-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -S-, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -S-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-S-, o -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -S-.

En algunos aspectos, el grupo R^{17} de Fórmula Xa está opcionalmente sustituido por una Unidad Básica (UB) tal como un resto aminoalquilo, por ejemplo $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$, y $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^{a_2}$, donde x es un número entero de 1 a 4 y cada R^a se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} , o dos grupos R^a son combinados con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidino, pirrolidinilo o piperidinilo.

Una Unidad Estiradora ilustrativa es la de Fórmula Xa o Xb en la que R^{17} es -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, - $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ heteroalquileo-C(=O)-, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -C(=O)-, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-C(=O)-, -arileno-C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-C(=O)-, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-C(=O)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -C(=O)-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-C(=O)-, o -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -C(=O)-.

Otra Unidad Estiradora ilustrativa es la de Fórmula Xa donde R^{17} es -alquileo $\text{C}_2\text{-C}_5$ -C(=O)-, donde el alquileo está opcionalmente sustituido por una Unidad Básica (UB) tal como un aminoalquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^{\text{op}}$, y $-(\text{CH}_2)_x\text{N}(\text{R}^{\text{op}})_2$, donde x es un número entero de 1-4 y cada R^{op} está seleccionado independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} , o dos grupos R^{op} se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidino, pirrolidinilo o piperidinilo. Durante la síntesis, el grupo funcional amino básico de la Unidad Básica puede protegerse mediante un grupo protector.

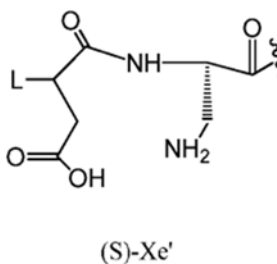
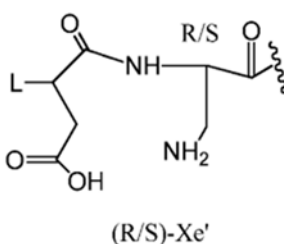
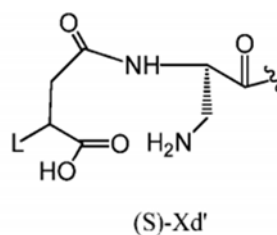
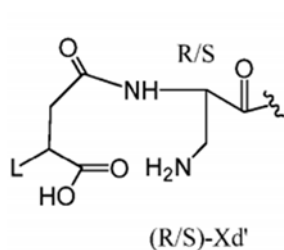
Las formas de realización ejemplares de unidades de estiramiento unidas a una Unidad de Ligando son las siguientes:



donde la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión a B, A o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II',
o a B, A o W de Fórmula III (i) o III (i)',
o a B, A o Y de Fórmula III (ii) o III (ii)',
dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B.

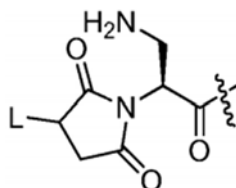
Se entenderá que una succinimida sustituida con ligando puede existir en forma(s) hidrolizada(s)).

En algunas formas de realización, una Unidad Estiradora (Z) se compone de un resto de ácido-amida que, cuando se une a L, se representa mediante la estructura de Fórmula Xd' o Xe':

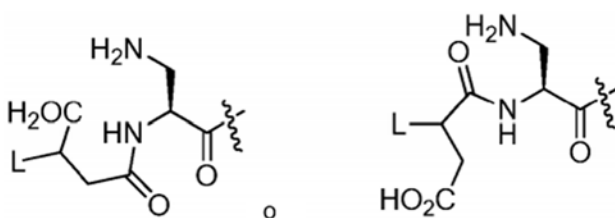


en la que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión a B, A o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II'.

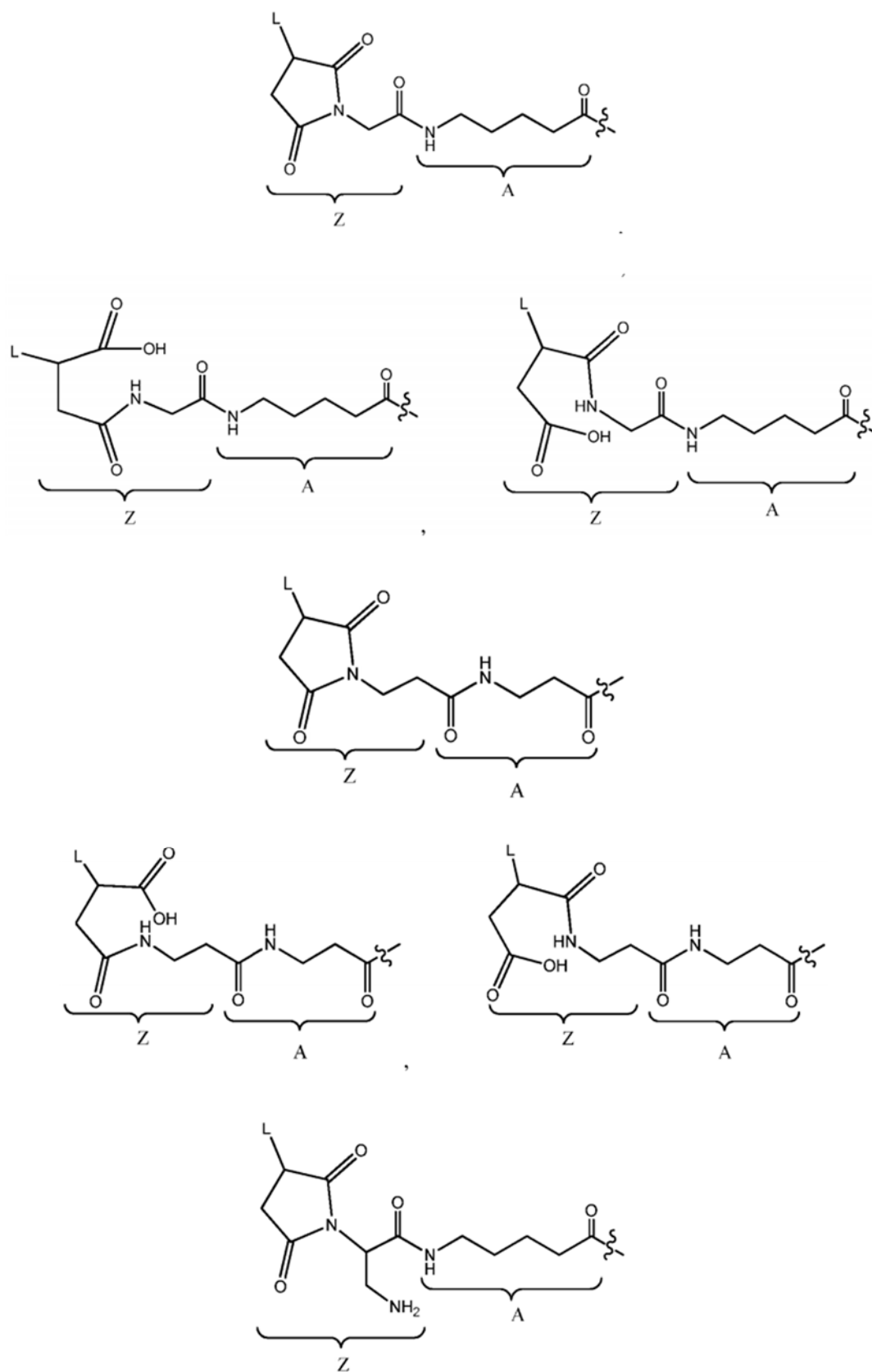
En formas de realización preferidas, una Unidad Estiradora (Z) se compone de un resto de succinimida que cuando se une a L se representa por la estructura de

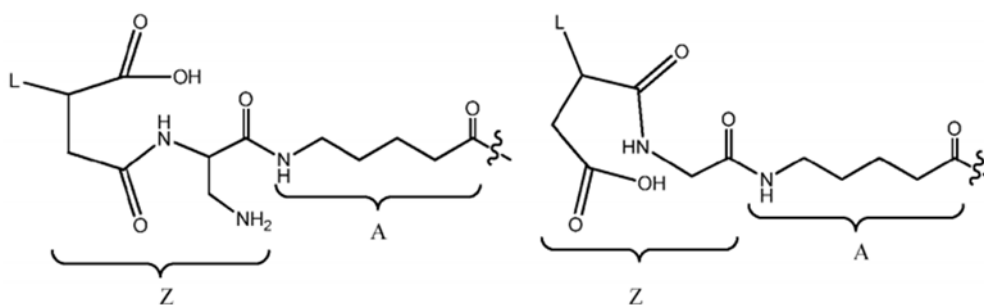


o se compone de un resto de ácido-amida que cuando se une a L se representa por la estructura de:



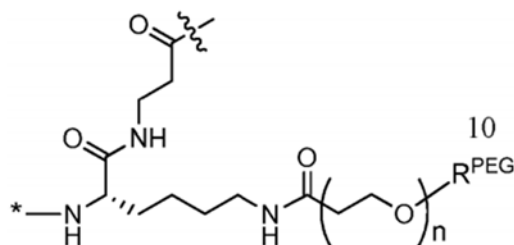
Las unidades de estiramiento ilustrativas unidas a una Unidad de Ligando (L) y una Unidad Conectora (A) tienen las siguientes estructuras:





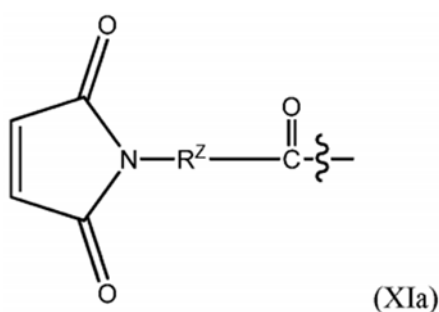
en las que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión a B, A o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II'.

Otras unidades de estiramiento unidas a una Unidad de Ligando (L) y una Unidad Conectora (A) tienen las estructuras anteriores donde A en las estructuras ZA anteriores se reemplaza por una Unidad Conectora que tiene la estructura



en la que n varía de 8 a 24; R^{PEG} es un grupo de protección de la unidad PEG, preferiblemente CH_3 o $-CH_2CH_2CO_2H$, el asterisco (*) indica unión covalente a una Unidad Estiradora correspondiente en estructura a la Fórmula Xa y la línea ondulada indica unión covalente a X de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora.

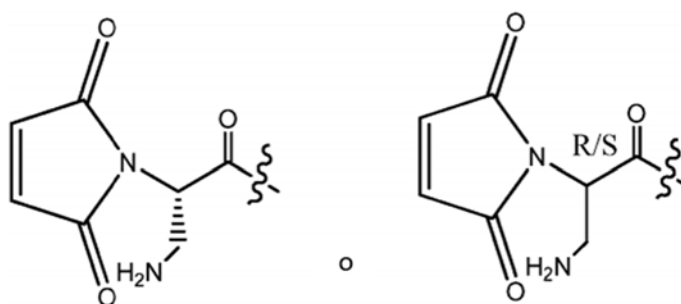
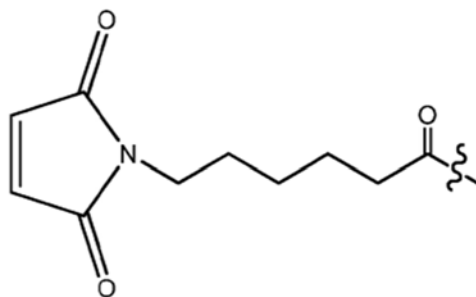
Las Unidades de extensión ilustrativas antes de la conjugación con la Unidad de Ligando (es decir, los precursores de la Unidad Estiradora) están compuestas por un resto de maleimida y están representadas por estructuras que incluyen la de Fórmula Xla:



en la que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión a B, A, o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en Fórmula II o II'; y

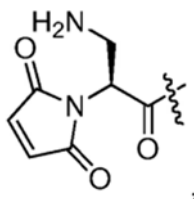
R_Z es $-(CH_2)_{2-5}-$, opcionalmente sustituido con una Unidad Básica tal como un aminoalquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^{op}$, y $-(CH_2)_xN(R^{op})_2$, donde x es un número entero de 1 a 4 y cada R^{op} se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} y haloalquilo C_{1-6} , o dos grupos R^{op} se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidino, pirrolidino o piperidino.

En algunas formas de realización preferidas de Fórmula Xla, un precursor de la Unidad de estirado (Z') está representado por una de las siguientes estructuras:



en el que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión a B, A o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II'.

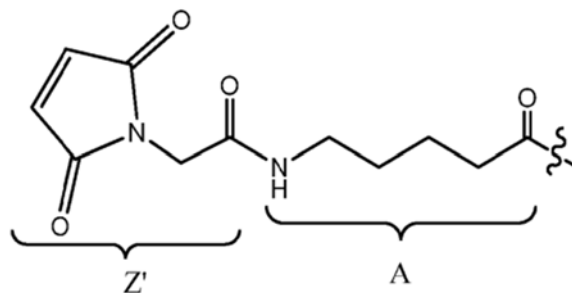
En formas de realización más preferidas, el precursor de la Unidad Estiradora (Z') está compuesto por un resto de maleimida y está representado por la estructura de:

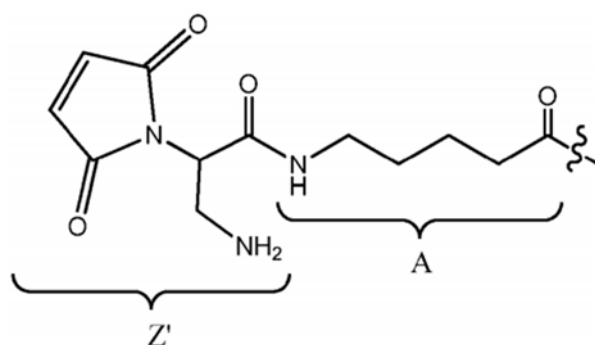
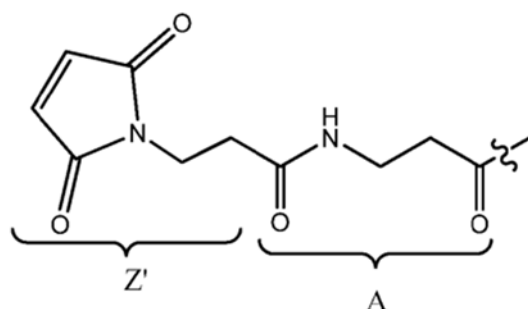


en la que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión a B, A o X del Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II'.

En unidades de estiramiento que tienen un resto UB, se entenderá que el grupo funcional amino de ese resto puede estar protegido por un grupo protector de amino durante la síntesis, por ejemplo, un grupo protector lábil en medio ácido (por ejemplo, BOC).

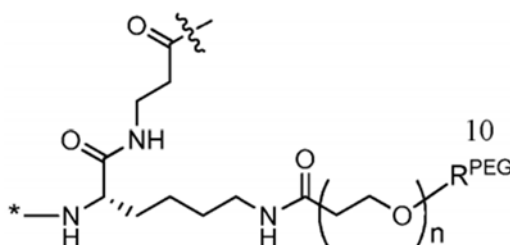
Los precursores ilustrativos de la Unidad Estiradora unidos covalentemente a una Unidad Conectora tienen las siguientes estructuras:





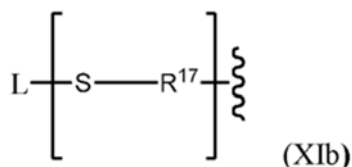
en las que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión a B, A o X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en la Fórmula II o II'.

Otros precursores de unidades de estiramiento unidos a una Unidad Conectora (A) tienen las estructuras anteriores donde A en las estructuras Z'-A anteriores se reemplaza por una Unidad Conectora que tiene la estructura



en la que el subíndice n varía de 8 a 24; R^{PEG} es un grupo de protección de la Unidad PEG, preferiblemente -CH₃ o -CH₂CH₂CO₂H, el asterisco (*) indica unión covalente al precursor de la Unidad Estiradora correspondiente en estructura a la Fórmula XIa y la línea ondulada indica unión covalente a X de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora.

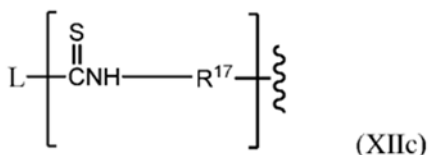
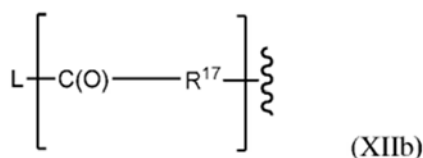
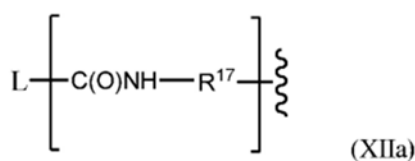
En otra forma de realización, la Unidad Estiradora se une a la Unidad de Ligando a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la Unidad de Ligando y un átomo de azufre de la Unidad Estiradora. Una Unidad Estiradora representativa de esta forma de realización se representa entre corchetes de Fórmula XIb:



en la que la línea ondulada indica unión a la Unidad de Ramificación (B), Unidad Conectora (A), si B está ausente, o un resto auto-inmolador (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, si A y B están ausentes como se define aquí y R¹⁷ es -alquileo C₁-C₁₀-, -C₁-C₁₀ heteroalquileo-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-C(=O)-, -C₁-C₁₀ heteroalquileo-C(=O)-, -carbociclo C₃-C₈-C(=O)-, -O-(alquilo C₁-C₈)-C(=O)-, -arileno-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-C(=O)-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀ -C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-C(=O)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-

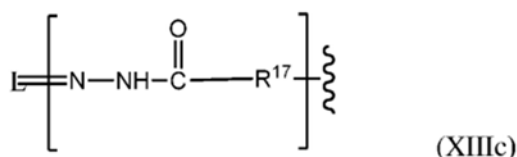
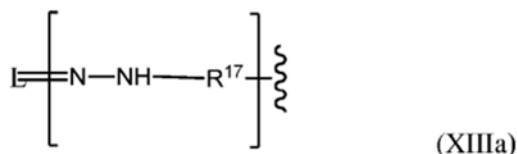
C₁₀-C(=O)-, -heterociclo C₃-C₈-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-C(=O)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-NH-, heteroalquileo C₁-C₁₀-NH-, -carbociclo C₃-C₈-NH-, -O-(alquilo C₁-C₈)-NH-, -arileno-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-NH-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-NH-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-NH-, -heterociclo C₃-C₈-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-NH-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-S-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-S-, -carbociclo C₃-C₈-S-, -O-(alquilo C₁-C₈)-S-, -arileno-S-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-S-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-S-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-S-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-S-, -heterociclo C₃-C₈-S-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-S-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-S-.

En otra forma de realización más, el grupo reactivo de un precursor de la Unidad Estiradora contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de una Unidad de Ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las Unidades Estiradoras representativas de esta forma de realización se representan entre corchetes de las Fórmulas XIIa, XIIb y XIIc:



en las que la línea ondulada indica unión a la Unidad de Ramificación (B), la unidad de conexión (A) o un resto de autoinmolación (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora y R¹⁷ es -alquileo C₁-C₁₀-, -C₁-C₁₀ heteroalquileo-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-C(=O)-, -C₁-C₁₀ heteroalquileo-C(=O)-, -carbociclo C₃-C₈-C(=O)-, -O-(alquilo C₁-C₈)-C(=O)-, -arileno-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-C(=O)-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-C(=O)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-C(=O)-, -heterociclo C₃-C₈-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-C(=O)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-C(=O)-, -alquileo C₁-C₁₀-NH-, heteroalquileo C₁-C₁₀-NH-, -carbociclo C₃-C₈-NH-, -O-(alquilo C₁-C₈)-NH-, -arileno-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-NH-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-NH-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-NH-, -heterociclo C₃-C₈-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-NH-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-NH-, -alquileo C₁-C₁₀-S-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-S-, -carbociclo C₃-C₈-S-, -O-(alquilo C₁-C₈)-S-, -arileno-S-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-S-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-S-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-S-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-S-, -heterociclo C₃-C₈-S-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-S-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-S-.

En otro aspecto más, el grupo reactivo del precursor de la Unidad Estiradora contiene un nucleófilo reactivo que es capaz de reaccionar con un electrófilo presente en un Ligando o introducido en él. Por ejemplo, un resto de carbohidrato en un ligando dirigido se puede oxidar suavemente usando un reactivo como el peryodato de sodio y el grupo funcional electrofílico resultante (-CHO) del carbohidrato oxidado se puede condensar con un precursor de la Unidad Estiradora que contiene un nucleófilo reactivo como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina o una arilhidrazida como las descritas por Kaneko, T. et al. (1991) Bioconjugate Chem. 2:133-41. Las Unidades Estiradoras representativas de esta forma de realización se representan entre corchetes de las Fórmulas XIIIa, XIIIb y XIIIc:



en las que la línea ondulada indica unión a la Unidad de Ramificación o Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, o Unidad Conectora como se define en este documento y R^{17} es -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)-, -arileno-, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-C}(=\text{O})$ -, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-C}(=\text{O})$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-C}(=\text{O})$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)- $\text{C}(=\text{O})$ -, -arileno- $\text{C}(=\text{O})$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno- $\text{C}(=\text{O})$ -, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-C}(=\text{O})$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- $\text{C}(=\text{O})$ -, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-C}(=\text{O})$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-C}(=\text{O})$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- $\text{C}(=\text{O})$ -, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-C}(=\text{O})$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-NH}$ -, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-NH}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-NH}$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)- NH -, -arileno- NH -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno- NH -, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-NH}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- NH -, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-NH}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-NH}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- NH -, -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-NH}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-S}$ -, heteroalquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-S}$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-S}$ -, -O-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$)- S -, -arileno- S -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno- S -, -arileno-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-S}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- S -, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-S}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8\text{-S}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)- S -, o -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}\text{-S}$ -.

En algunos aspectos de la invención preventiva, la Unidad Estiradora tiene una masa de no más de aproximadamente 1.000 dalton, no más de aproximadamente 500 dalton, no más de aproximadamente 200 dalton, de aproximadamente 30, 50 o 100 dalton a aproximadamente 1.000 dalton, desde alrededor de 30, 50 o 100 daltons hasta alrededor de 500 daltons, o desde alrededor de 30, 50 o 100 daltons hasta alrededor de 200 daltons.

Unidad de Ramificación Opcional (B):

Se incluye una Unidad de Ramificación (B) en los Conjugados de Fármaco-Ligando en los casos en los que es deseable tener múltiples Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras en una Unidad Enlazadora y, por lo tanto, tener múltiples Unidades de Fármaco para cada resto enlazador de fármaco unido a la Unidad de Ligando de un LDC y, en última instancia, para aumentar el número de Unidades de fármaco en un LDC más allá del número de sitios de unión en su Unidad de Ligando. Una Unidad de Ramificación proporciona un enlace covalente entre B y una Unidad Estiradora (Z) o un precursor de la misma (Z') y dos, tres o cuatro Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras (SI), opcionalmente cada una a través de una Unidad Conectora intermedia seleccionada independientemente, A. El experto en la materia apreciará que una Unidad de Ramificación está diseñada de tal manera que permita la ramificación requerida dentro de la Unidad Enlazadora. Por ejemplo, para actuar como una Unidad de Ramificación para dos Unidades de fármaco (es decir, t es 2), la Unidad de Ramificación tiene al menos un primer, segundo y tercer sitio de unión dentro del conjugado (es decir, un primer sitio de unión a Z, y un segundo y tercer sitio de unión para la unión a cada A o X, dependiendo de la presencia o ausencia de cada A. En otras palabras, la Unidad de Ramificación debe ser al menos trifuncional.

Se contemplan en la presente invención aquellos LDC y Compuestos enlazadores de fármacos en los que el subíndice t es 3 o 4. En tales aspectos, la Unidad de Ramificación tendrá cuatro o cinco sitios de unión covalente dentro del conjugado. En algunos aspectos, la Unidad de Ramificación se compone de uno o más (p. ej., 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) residuos de aminoácidos, alcohol amino, amino aldehído o poliamina naturales o no naturales o combinaciones de los mismos que colectivamente proporciona la funcionalidad requerida para ramificación. En alguna forma de realización, la Unidad de Ramificación está compuesta por un residuo trifuncional y puede tener residuos flanqueantes que son bifuncionales para proporcionar los sitios de unión primero y segundo. En formas de realización que tienen ramificación para acomodar 3 o 4 Unidades de Fármaco en una sola Unidad Enlazadora, las Unidades de Ramificación normalmente se componen de 2 o 3 residuos de ramificación trifuncionales, y pueden estar compuestas

adicionalmente por residuos flanqueantes y/o intermedios que son bifuncionales.

Se apreciará que cuando se hace referencia a aminoácidos naturales o no naturales, amino alcoholes, amino aldehídos o poliaminas presentes en un conjugado de fármaco ligando o intermedios del mismo, como un compuesto enlazador de fármaco (ya sea parte de una Unidad de Ramificación u otro componente de un LDC o Intermedio de enlace de fármaco del mismo), el aminoácido, el aminoalcohol, el aminoaldehído o las poliaminas existirán en forma residual. Por ejemplo, en formas de realización en las que la Unidad de Ramificación son dos aminoácidos, los dos aminoácidos existirán como residuos con un enlace peptídico entre ellos.

En las formas de realización en las que la Unidad de Ramificación está compuesta por un aminoalcohol, el aminoalcohol existirá como un residuo en el que, por ejemplo, su grupo amino está unido a otro residuo de la Unidad de Ramificación u otro componente de la LDC o del intermedio de fármaco-enlazador del mismo a través de un grupo funcional que contiene carbonilo de ese otro residuo/componente, mientras que su grupo hidroxilo está unido como un éter a, o está unido a través de un grupo funcional que contiene carbonilo, de otro residuo más de la Unidad de Ramificación u otro componente del LDC o el intermedio de enlace de fármaco del mismo.

En las formas de realización en las que la Unidad de Ramificación está compuesta por un aminoaldehído, el aminoaldehído existirá como un residuo en el que, por ejemplo, su grupo amino está unido a otro residuo de la Unidad de Ramificación u otro componente de la LDC o Intermedio de la misma a través de un grupo funcional que contiene carbonilo de ese otro residuo/componente mientras que su grupo funcional aldehído se convierte en un grupo funcional imino o a través de su reducción posterior para proporcionar un enlace nitrógeno-carbono cuando se une a un grupo amino de otro residuo más de la ramificación Unidad u otro componente del Conjugado. Un aminoaldehído puede derivar de un aminoácido natural o no natural por reducción parcial de su grupo funcional de ácido carboxílico a un grupo funcional aldehído (es decir, -CHO).

Para tener un tercer grupo funcional que sirva como residuo de ramificación trifuncional en una Unidad de Ramificación, un aminoácido u otro residuo de ácido que contiene amina dentro de la Unidad de Ramificación puede tener o puede sustituirse con una cadena lateral funcionalizada para proporcionar los tres puntos de unión requeridos para tal residuo de ramificación. Por ejemplo, la serina tiene tres grupos funcionales, es decir, grupos funcionales de ácido, amino e hidroxilo, y puede verse como un residuo de aminoácido y aminoalcohol combinado con el fin de actuar como una Unidad de Ramificación. La tirosina también contiene un grupo hidroxilo, en este caso en su cadena lateral fenólica, y también puede verse de forma similar a la serina a los efectos de su incorporación como residuo de ramificación trifuncional en una Unidad de Ramificación.

En otro ejemplo, cuando el residuo de ramificación trifuncional de una Unidad de Ramificación es cisteína, su grupo amino y ácido carboxílico existirá en forma residual de una manera discutida previamente para los aminoácidos o ácidos que contienen amina para proporcionar dos de los tres puntos de unión necesarios para un residuo de ramificación, mientras que su grupo tiol existirá en forma residual cuando se une a un resto -X-D o -A-X-D de una Unidad Enlazadora como un disulfuro o en un enlace azufre-carbono como, por ejemplo, cuando la cisteína tiol funcional reacciona con un resto que contiene maleimida de un precursor de la Unidad Conectora. En algunos casos, el grupo tiol residual está en su forma oxidada (es decir, -S(=O)- o -S(=O)₂-) cuando se une a otro residuo de la Unidad de Ramificación o a otro componente de la Unidad Enlazadora. En otro ejemplo más, el grupo alfa amino y ácido carboxílico de una lisina existirá en forma residual para proporcionar dos de los tres puntos de unión necesarios para un residuo de ramificación de una Unidad de Ramificación, mientras que el grupo épsilon amino en su forma residual proporciona el tercer punto de unión. La histidina también puede verse como un aminoácido con dos grupos amino, donde el segundo grupo amino es el NH de la cadena lateral que contiene imidazol.

En otro ejemplo, cuando el residuo de ramificación trifuncional de una Unidad de Ramificación es ácido aspártico o glutámico, los grupos alfa amino y ácido carboxílico C-terminal del aminoácido en sus formas residuales proporcionan dos de los tres puntos de unión requeridos. para un residuo de ramificación de una Unidad de Ramificación, mientras que su grupo de ácido carboxílico beta o gamma en su forma residual proporciona el tercer punto de unión. En aquellos casos en los que un aminoácido natural es un residuo de una Unidad de Ramificación, pero no contiene naturalmente una cadena lateral de aminoácido funcionalizado, pero se requiere que sea un residuo de ramificación trifuncional dentro de la Unidad de Ramificación, se entiende que la estructura de aminoácido se modifica para tener un grupo funcional adicional además de sus grupos funcionales amino y ácido carboxílico cuando está en forma residual para proporcionar el tercer punto de unión requerido. Por ejemplo, un aminoácido que tiene una cadena lateral alifática puede estar sustituido en un carbono de esa cadena lateral con un grupo hidroxilo, amino, aldehído, tiol, ácido carboxílico u otro grupo funcional u otro resto (p. ej., un arilo o arilalquilo) sustituido con cualquiera de estos grupos funcionales para proporcionar un aminoácido no natural que tenga los tres puntos de unión necesarios. Dichos aminoácidos no naturales se incorporan a una Unidad de Ramificación como se describe anteriormente para los aminoácidos y las formas residuales de los grupos funcionales introducidos.

De manera similar, cuando un amino aldehído o amino alcohol se incorpora a una Unidad de Ramificación como un residuo de ramificación trifuncional, ese amino aldehído o amino alcohol tendrá un tercer grupo funcional para proporcionar, junto con sus grupos funcionales amino y aldehído, los tres puntos de unión necesarios. En esos casos, un aminoaldehído o aminoalcohol puede corresponder en estructura a un aminoácido natural que tiene una cadena lateral

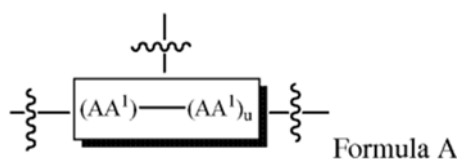
funcionalizada o un aminoácido no natural que tiene un grupo funcional que se introdujo en la cadena lateral de un aminoácido natural como se describe anteriormente en el que un ácido carboxílico del aminoácido natural o no natural se reduce a un grupo funcional hidroxilo o aldehído.

Un aminoácido incorporado en una Unidad de Ramificación como residuo de ramificación trifuncional puede ser un aminoácido alfa, beta o gamma u otro compuesto de ácido que contiene amina y puede estar en su isómero D o L si contiene un carbono quiral al que está unido una cadena lateral de aminoácido natural o no natural. Cuando la Unidad de Ramificación esté compuesta por más de un aminoácido natural o no natural, amino alcohol, amino aldehído o residuos de poliamina, los aminoácidos, amino alcoholes, amino aldehídos, residuos de poliamina o combinaciones de los mismos, en donde al menos uno de esos residuos es un residuo de ramificación trifuncional, estos residuos están unidos entre sí a través de enlaces covalentes para formar la Unidad de Ramificación.

El aminoácido, amino alcohol o amino aldehído puede no ser natural y puede modificarse para tener una cadena lateral funcionalizada para unirse a los componentes de los Conjugados o Compuestos Intermedios (como se describió anteriormente para un residuo de ramificación de una Unidad de Ramificación), según el caso puede ser. Ejemplos de aminoácidos, amino alcoholes o amino aldehídos funcionalizados incluyen, por ejemplo, aminoácidos, amino alcoholes o amino aldehídos funcionalizados con azido o alquino (p. ej., aminoácido, amino alcohol o amino aldehído modificado para tener un grupo azida o un grupo alquino para adjuntar usando química de clic). Métodos para la activación y reacción independientes de los grupos funcionales presentes en un aminoácido, por ejemplo, la porción de amina, la porción de ácido carboxílico y la porción de cadena lateral (ya sea, por ejemplo, un resto amino, un grupo hidroxilo, otro ácido carboxílico, tiol, azida o alquino) son bien conocidos en la técnica.

Una Unidad de Ramificación puede comprender 1 o más (típicamente de 1 a 5 o de 1 a 4 o de 1 a 3 o 1 o 2) aminoácidos, heteroalquilenos C₁₋₂₀ opcionalmente sustituidos (preferiblemente heteroalquileno C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido), heterociclos C₃₋₈ opcionalmente sustituidos, arilenos C₆₋₁₄ opcionalmente sustituidos, carbociclos C_{3-C₈} opcionalmente sustituidos, o combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, la Unidad de Ramificación comprende no más de 2 o no más de un heteroalquileno C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido, heterociclo C₃₋₈ opcionalmente sustituido, arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o carbociclo C_{3-C₈} opcionalmente sustituido. Los sustituyentes opcionales incluyen (=O), -X, -R, -OR, -SR, -NR², -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR², -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(O)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR², -C(=S)NR², o -C(=NR)NR², donde cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br o -I; y cada R es independientemente hidrógeno, o-alquilo C_{1-C₂₀}, -arilo C_{6-C₂₀}, o -heterociclo C_{3-C₁₄}, opcionalmente sustituido, o un grupo protector o un resto profármaco. Los sustituyentes opcionales preferidos son (=O), -X, -R, -OR, -SR y -NR². Se entenderá que dichos restos que actúan como residuos de ramificación serán sustituidos con funcionalidad para proporcionar los sitios de unión necesarios.

Una Unidad de Ramificación o un residuo de ramificación de una Unidad de Ramificación puede ser una cadena lineal o una cadena ramificada y puede representarse mediante la Fórmula A:



en la que

AA¹ es una subunidad de una Unidad de Ramificación seleccionada independientemente de un aminoácido, heteroalquileno C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido (preferiblemente heteroalquileno C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido), heterociclo C₃₋₈ opcionalmente sustituido, arileno C₆₋₁₄ opcionalmente sustituido o carbociclo C_{3-C₈} opcionalmente sustituido;

y el subíndice u se selecciona independientemente de 0 a 4; y la línea ondulada indica sitios de unión covalente dentro del Conjugado Ligando-Fármaco o un Intermedio de Fármaco-Enlazador del mismo. El heteroalquileno, heterociclo, arileno o carbociclo opcionalmente sustituido tendrá grupos funcionales para las uniones entre las subunidades de la Unidad de Ramificación y dentro de un Conjugado de Ligando-Fármaco o Intermedio de Enlazador-Fármaco del mismo que tiene esa Unidad de Ramificación.

En algunas formas de realización, al menos un caso de AA¹ es un aminoácido. El subíndice u puede ser 0, 1, 2, 3 o 4. En algunas formas de realización, AA¹ es un aminoácido y u es 0. En algunas formas de realización, una Unidad de Ramificación se compone de no más de 2 heteroalquilenos C₁₋₂₀ opcionalmente sustituidos, heterociclos C₃₋₈ opcionalmente sustituidos, arilenos C₆₋₁₄ opcionalmente sustituidos o carbociclos C_{3-C₈} opcionalmente sustituidos. En

algunos aspectos, en los que la Unidad de Ramificación tiene la Fórmula A, la Unidad de Ramificación comprende no más de 1 heteroalquileo C_{1-20} opcionalmente sustituido, heterociclo C_{3-8} opcionalmente sustituido, arileno C_{6-14} opcionalmente sustituido o carbociclo C_3-C_8 .

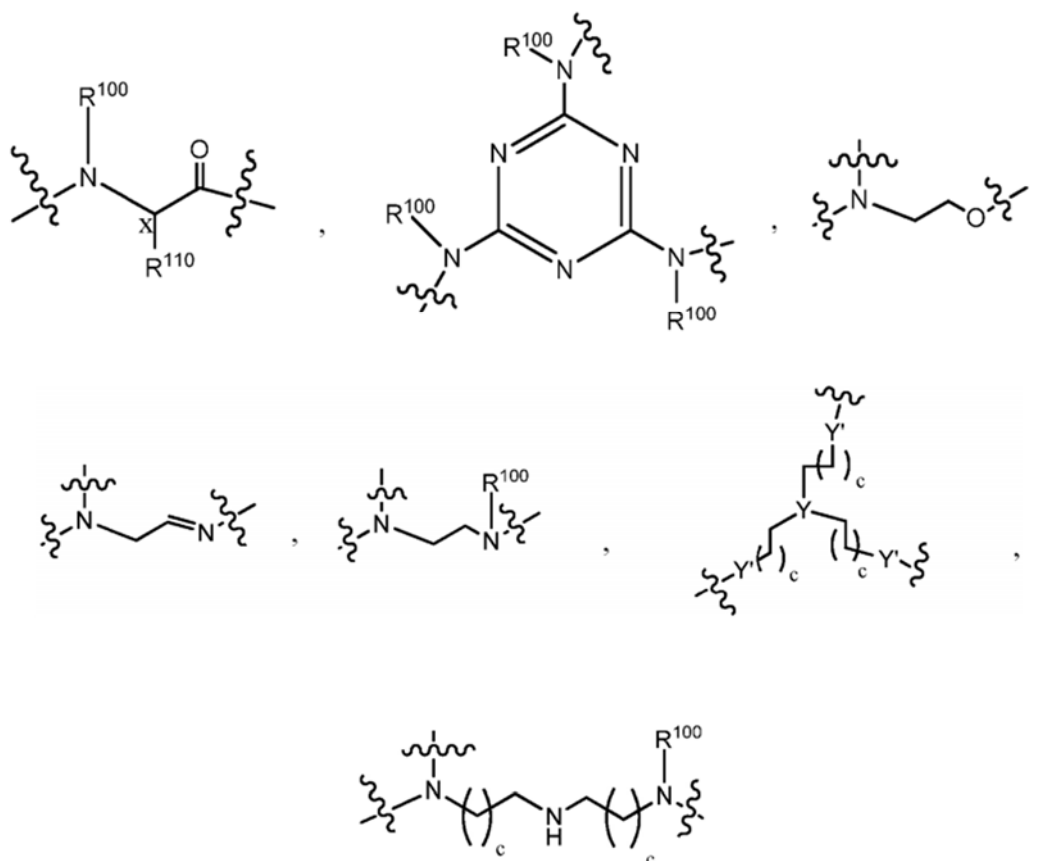
Una Unidad de Ramificación o una subunidad de aminoácido de la misma puede ser un aminoácido alfa, beta o gamma y puede ser natural o no natural. El aminoácido puede ser un isómero D o L. La unión dentro de la Unidad de Ramificación o con los otros componentes de la LDC o el Intermedio de enlace de fármaco de la misma puede ser, por ejemplo, a través de grupos amino, carboxilo u otros grupos funcionales. Los métodos para la activación y reacción independientes de los grupos funcionales son bien conocidos en la técnica.

Una Unidad de Ramificación o una subunidad de aminoácido de la misma puede seleccionarse independientemente del isómero D o L de un aminoácido que contiene tiol. El aminoácido que contiene tiol puede ser, por ejemplo, cisteína, homocisteína o penicilamina.

Una Unidad de Ramificación o una subunidad de aminoácido de la misma puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en los isómeros L o D de los siguientes aminoácidos: Alanina (incluyendo β -alanina), arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, metionina, serina, tirosina, treonina, triptófano, prolina, ornitina, penicilamina, B-alanina, ácido aminoalquinoico, ácido aminoalcanodioico, ácido heterociclocarboxílico, citrulina, estatina, ácido diaminoalcanoico, y derivados de los mismos.

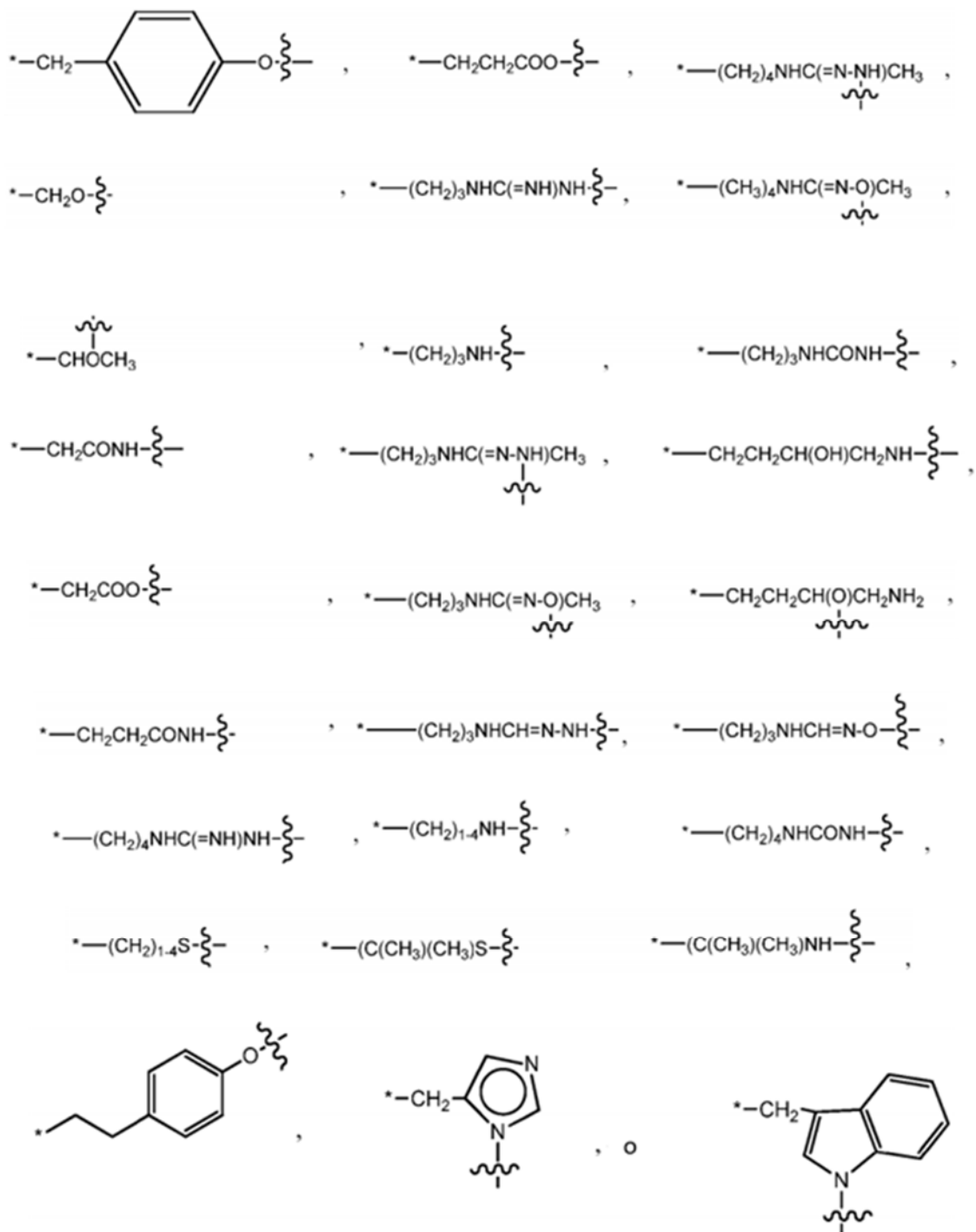
Los aminoácidos preferidos incluyen cisteína, homocisteína, penicilamina, ornitina, lisina, serina, treonina, glutamina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, selenocisteína, prolina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, valina y alanina.

En algunas formas de realización en las que la Unidad de Ramificación es capaz de conectar dos Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras a una Unidad Estiradora (cada una opcionalmente a través de una Unidad conectora, A seleccionada de forma independiente), la Unidad de Ramificación, una vez ensamblada, tiene la Fórmula Indicada a continuación:



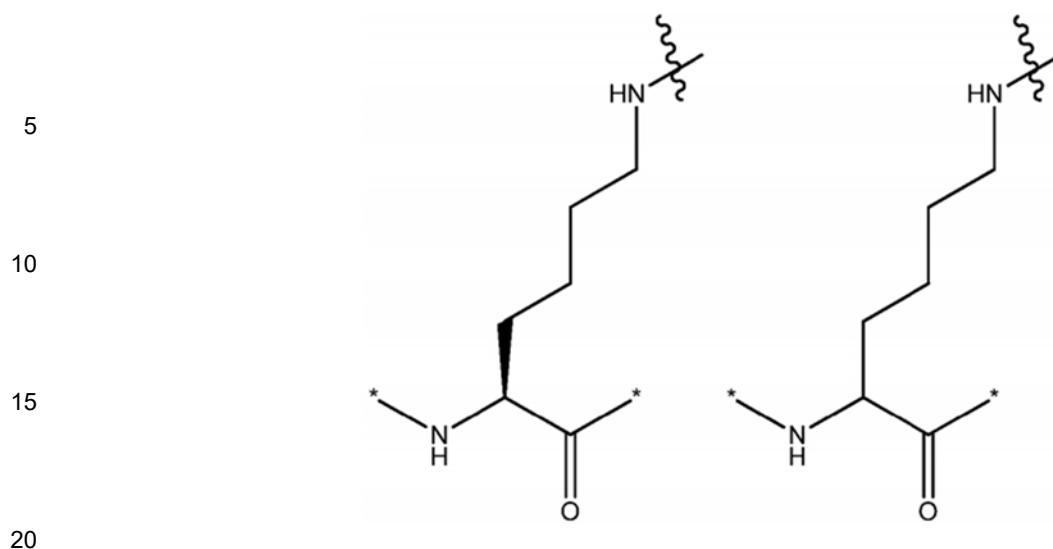
o

donde la línea ondulada indica los sitios de unión a los componentes de la Unidad Enlazadora, es decir, a la Unidad Estiradora Z o su precursor Z' y a la(s) Unidad(es) de Ensamblaje Auto-Inmolador o la(s) Unidad(es) Conectora(s) intermedia(s), y donde R^{110} es



en el que el asterisco indica la unión al carbono marcado x y la línea ondulada indica uno de los sitios de unión;
 cada R^{100} se selecciona independientemente de hidrógeno o-alkilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, preferiblemente hidrógeno o CH_3 ;
 Y se selecciona independientemente de N o CH;
 cada Y' se selecciona independientemente de NH, O o S; y
 el subíndice c es un número entero seleccionado independientemente de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 3.

Una Unidad de Ramificación ejemplar o un residuo de ramificación trifuncional en una Unidad de Ramificación es lisina,
 como se muestra a continuación, donde la línea ondulada y los asteriscos indican un enlace covalente dentro de la Unidad
 Enlazadora de un LDC o Intermedio de Enlazador de Fármacos del mismo:



25 En algunos aspectos de la invención preventiva, la Unidad de Ramificación tiene una masa de no más de aproximadamente 1000 daltons, no más de aproximadamente 500 daltons, no más de aproximadamente 200 daltons, de aproximadamente 10, 50 o 100 daltons a aproximadamente 1000 daltons, de aproximadamente 10, 50 o 100 daltons a aproximadamente 500 daltons, o de aproximadamente 10, 50 o 100 daltons a aproximadamente 200 daltons.

Unidad Conectora (A)

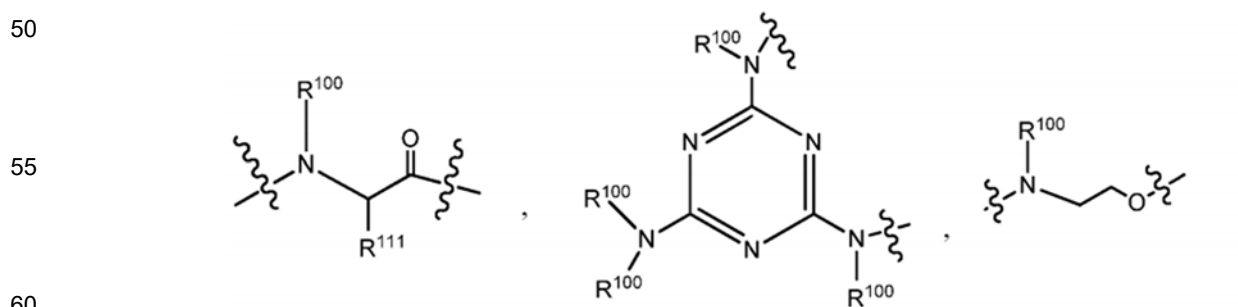
30 Una Unidad Conectora, A, se incluye en un Conjugado Ligando-Fármaco o Compuesto Enlazador-Fármaco en los casos en los que es deseable añadir una distancia adicional entre la Unidad Estiradora (Z) o su precursor (Z') y un resto de autoinmolación (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. En algunos aspectos, la distancia adicional ayudará con la activación dentro de X. En consecuencia, la Unidad Conectora (A), cuando está presente, amplía el marco de la Unidad Enlazadora. En ese sentido, una Unidad Conectora (A) se une covalentemente con la Unidad de Ramificación

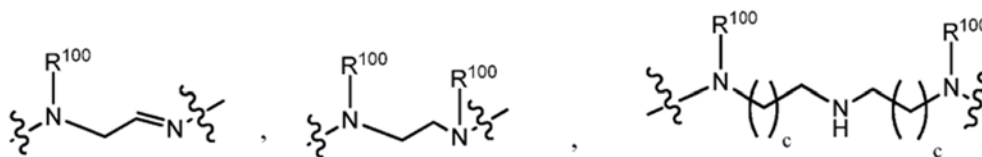
35 opcional o la Unidad Estiradora (o su precursora) cuando B está ausente en un extremo y está unida covalentemente al resto auto-inmolador (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora en su otro terminal. En un grupo de formas de realización, el resto auto-inmolador (X) está compuesto por una Unidad Espaciadora (Y) y una Unidad de Activación (W) Auto-Inmoladoras, de modo que A se une a Y. En otro grupo de formas de realización, el resto auto-inmolador está compuesto por una Unidad Espaciadora (Y) auto-inmoladora y una Unidad de Activación (W) de modo que A se una a W.

40 El experto en la materia apreciará que la Unidad Conectora puede ser cualquier grupo que sirva para proporcionar la unión de la Unidad Auto-Inmoladora al resto de la Unidad Enlazadora. La Unidad Conectora puede estar, por ejemplo, compuesta por uno o más (p. ej., 1-10, preferiblemente, 1, 2, 3 o 4) residuos de aminoácido, amino alcohol, amino aldehído, diamino naturales o no naturales. En algunos aspectos, la Unidad Conectora es un solo aminoácido natural o no natural, amino alcohol, amino aldehído o residuo de diamino. Un ejemplo de aminoácido capaz de actuar como

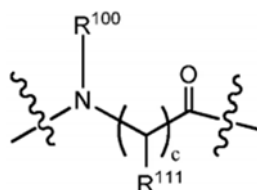
45 unidades conectoras es la β -alanina.

En algunos aspectos, la Unidad Conectora tiene la Fórmula Indicada a continuación:



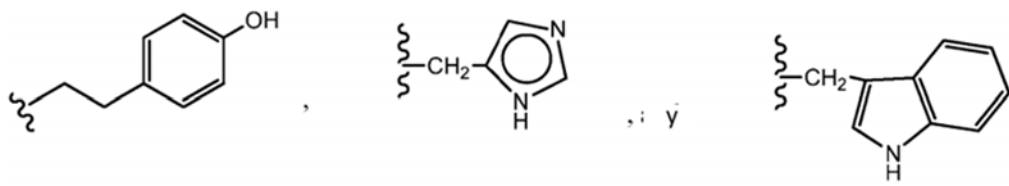


o



en el que las líneas onduladas indican la unión de la Unidad Conectora dentro del Conjugado de Fármaco Ligando o Intermedio Enlazador de Fármaco del mismo;

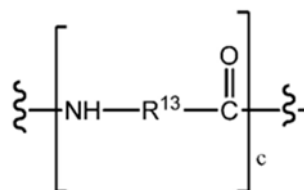
donde R^{111} se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, p-hidroxibencilo, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-,



en el que la línea ondulada indica unión covalente al resto de la Unidad Conectora;

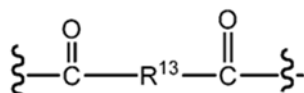
cada R^{100} se selecciona independientemente de hidrógeno o -alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, preferiblemente hidrógeno o CH_3 ; y el subíndice c es un número entero seleccionado independientemente que va de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 3.

Una Unidad Conectora representativa que tiene un grupo carbonilo para unirse a la Unidad de Activación (W) o a la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y) de un resto auto-inmolador de la unidad de ensamblaje inmolador (X) es el siguiente:



en el que, en cada caso, R^{13} se selecciona independientemente del grupo que consiste en -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -arileno-, -heteroalquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arileno-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, y -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, y el subíndice c es un número entero que oscila entre 1 y 4. En algunas formas de realización, R^{13} es $\text{-C}_1\text{-C}_6$ alquilenos y el subíndice c es 1.

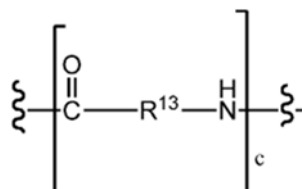
Una Unidad Conectora que tiene un grupo carbonilo para unir a la Unidad de Activación (W) o la Unidad Espaciadora (Y) del resto auto-inmolador (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es la siguiente:



donde R^{13} es -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_6$ -, -carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -arileno-, -heteroalquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -arileno-, -arileno-alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquilenos $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -

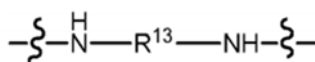
(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-. En algunas formas de realización, R¹³ es -alquileo C₁-C₆.

Una Unidad Conectora representativa que tiene un resto NH que se une a la Unidad de Activación (W) o a la Unidad Espaciadora (Y) del resto auto-inmolador (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es la siguiente:



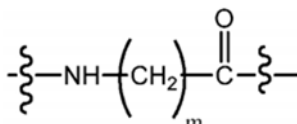
en la que, en cada caso, R¹³ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -alquileo C₁-C₆-, -carbociclo C₃-C₈-, -arileno-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, y -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, y el subíndice c es de 1 a 14. En algunas formas de realización, R¹³ es -alquileo C₁-C₆ y el subíndice c es 1.

Una Unidad Conectora representativa que tiene un resto NH que se une a la Unidad de Activación (W) o Unidad Espaciadora (Y) de un resto auto-inmolador de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (X) es como sigue:

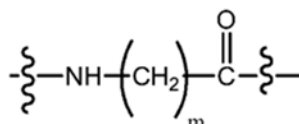
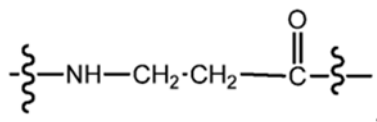


donde R¹³ es -alquileo C₁-C₆-, -carbociclo C₃-C₈-, -arileno-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀- o -C(=O)-alquileo C₁-C₆- o -alquileo C₁-C₆-C(=O)-alquileo C₁-C₆.

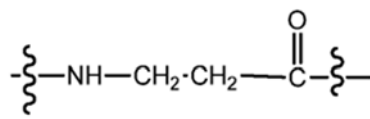
Las formas de realización seleccionadas de Unidades Conectoras incluyen aquellas que tienen la siguiente estructura



o



o

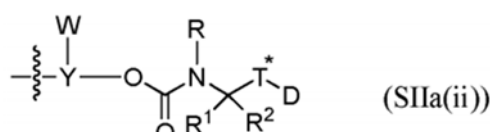
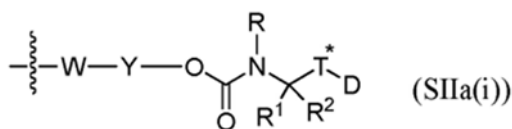


donde la línea ondulada adyacente al nitrógeno indica unión covalente a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de B, y la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión covalente a la Unidad de Activación (W) o la Unidad Espaciadora (Y) del resto auto-inmolador (X) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, o la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión covalente a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de B, y la línea ondulada adyacente al nitrógeno indica unión covalente a la Unidad de Activación (W) o la Unidad Espaciadora (Y) de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (X); y el subíndice m es un número entero que va de 1 a 6, preferiblemente de 2 a 6, más preferiblemente de 2 a 4.

Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora

La Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora vincula la unidad de fármaco con el resto del conjugado o su Intermedio de Fármaco-Enlazador. La función principal de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es liberar condicionalmente el fármaco libre en el sitio objetivo de la Unidad de Ligando. En ese sentido, la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora comprende un resto auto-inmolador activable (X) y un enlazador de carbamato de metileno. El resto auto-inmolador activable comprende una Unidad de Activación (W) y una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y). La Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora puede ser una sola unidad o puede comprender dos o más subunidades de autoinmolación. La activación de W para inducir la autoinmolación de Y se realiza a través de la escisión en esa Unidad de Activación y generalmente ocurre en el enlace entre W e Y. La escisión puede ser enzimática (p. ej., proteasa o glucosidasa asociada a tumores como la glucuronidasa) o mediante una reducción de disulfuro (por ejemplo, escisión de disulfuro (por ejemplo, por glutatión-SH)). Tras la escisión, se inicia una secuencia de reacción de autoinmolación que conduce a la liberación del fármaco libre. En un grupo de formas de realización, la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora se puede unir al resto de la Unidad de Ligando del conjugado de fármaco y ligando a través de la Unidad de Activación. En otro grupo de formas de realización, la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora se puede unir al resto de una Unidad Enlazadora de conjugado de ligando y fármaco a través de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora.

En determinadas formas de realización, una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora unida a una Unidad de fármaco se representa mediante la Fórmula SIa(i) o SIa(ii):



en la que

W es una Unidad de Activación;
Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora;
D es una Unidad de Fármaco que representa un fármaco que tiene un grupo funcional antes de la incorporación en la unidad de carbamato de alcoximetileno indicada;
T* es un átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno indicada;
R, R¹ y R² son como se han definido anteriormente en este documento; y
la línea ondulada indica el punto de unión al resto del LDC o compuesto enlazador de fármaco, en el que la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora libera fármaco libre tras la activación de la Unidad de Activación.

Como se indica en el presente documento, la activación de la Unidad de Activación se realiza a través de la escisión de esa unidad, en la que la escisión es enzimática (p. ej., a través de proteasa o glucosidasa asociada a tumores, p. ej., glucuronidasa (p. ej., beta-glucuronidasa)) o a través de una reacción de reducción de disulfuro (p. ej., escisión de disulfuro por glutatión-SH).

En algunos aspectos de la invención preventiva, una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora tiene una masa de no más de aproximadamente 5000 dalton, no más de aproximadamente 4000 dalton, no más de aproximadamente 3000 dalton, no más de aproximadamente 2000 dalton, no más de aproximadamente 1000 daltons, no más de aproximadamente 800

daltons, o no más de aproximadamente 500 daltons. En algunos aspectos, una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora tiene una masa de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 5000 daltons, de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 4000 daltons, de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 3000 daltons, de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 2000 daltons, de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 1000 daltons, de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 800 daltons, o de aproximadamente 100 daltons, o de aproximadamente 200 daltons, o desde aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 500 daltons.

Un experto en la técnica comprenderá que los componentes de los compuestos de enlace de fármaco se pueden unir de la misma manera que los conjugados de fármaco-ligando en los que, en comparación con el LDC correspondiente, la Unidad de Ligando está ausente y la Unidad Estiradora (Z) cuando está presente se reemplaza por su correspondiente Unidad Estiradora precursora (Z').

Unidad de Activación (W)

W es una Unidad de Activación y puede denominarse como "disparador" o disparador "activable" (es decir, capaz de activación); que cuando se activa inicia una secuencia de reacción de autoinmolación en una Unidad Espaciadora (como una sola unidad o con 2 o más subunidades de autoinmolación). En algunos aspectos, la Unidad de Activación es un resto orgánico unido mediante un enlace escindible a la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. En consecuencia, en dichas formas de realización, la estructura y/o secuencia de W se selecciona de manera que se forme un enlace escindible con la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. En las diversas formas de realización discutidas en este documento, la naturaleza de W puede variar. Por ejemplo, W puede diseñarse de manera que el enlace escindible se escinda por la acción de las enzimas presentes en el sitio objetivo o mediante un evento de reducción en el caso de un enlace disulfuro. Los enlaces escindibles incluyen, por ejemplo, enlaces disulfuro, enlaces amida y enlaces glucosídicos.

En algunas formas de realización, la Unidad de Activación comprenderá un aminoácido o una o más secuencias contiguas o no contiguas de aminoácidos (p. ej., de modo que W tenga de 1 a no más de 12 aminoácidos). La Unidad de Activación puede comprender o consistir en, por ejemplo, una unidad de mon péptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapéptido. En algunos aspectos, en presencia de una enzima (p. ej., una proteasa asociada a un tumor), se escinde un enlace amida entre la Unidad de Activación (W) y la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y), lo que finalmente conduce a la liberación de fármaco debido a la autoinmolación de Y.

Cada aminoácido puede ser natural o no natural y/o un isómero D o L siempre que, por supuesto, se forme un enlace escindible que, tras la escisión, inicia la autoinmolación en Y. En algunas formas de realización, la Unidad de Activación comprenderá solo aminoácidos naturales. En algunos aspectos, la Unidad de Activación tendrá de 1 a no más de 12 aminoácidos en secuencia contigua.

En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina, selenocisteína, ornitina, penicilamina, β -alanina, ácido aminoalcanoico, ácido aminoalquinoico, ácido aminoalcanodioico, ácido aminobenzoico, ácido aminoheterocicloalcanoico, ácido heterociclocarboxílico, citrulina, estatina, ácido diaminoalcanoico, y derivados de los mismos. En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina y selenocisteína. En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano y valina. En algunas formas de realización, cada aminoácido se selecciona de los aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos.

En otra forma de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en los siguientes L-aminoácidos (naturales): alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina.

En otra forma de realización, cada aminoácido se selecciona independientemente del grupo que consiste en los siguientes isómeros D de estos aminoácidos naturales: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina.

En ciertas formas de realización, la Unidad de Activación se compone solo de aminoácidos naturales. En otras formas de realización, la Unidad de Activación se compone únicamente de aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, la Unidad de Activación se compone de un aminoácido natural unido a un aminoácido no natural. En algunas

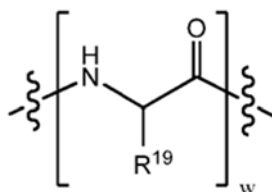
formas de realización, la Unidad de Activación está compuesta por un aminoácido natural unido a un isómero D de un aminoácido natural.

Las unidades de activación ejemplares incluyen dipéptidos tales como -Val-Cit-, -Phe-Lys- o -Val-Ala-.

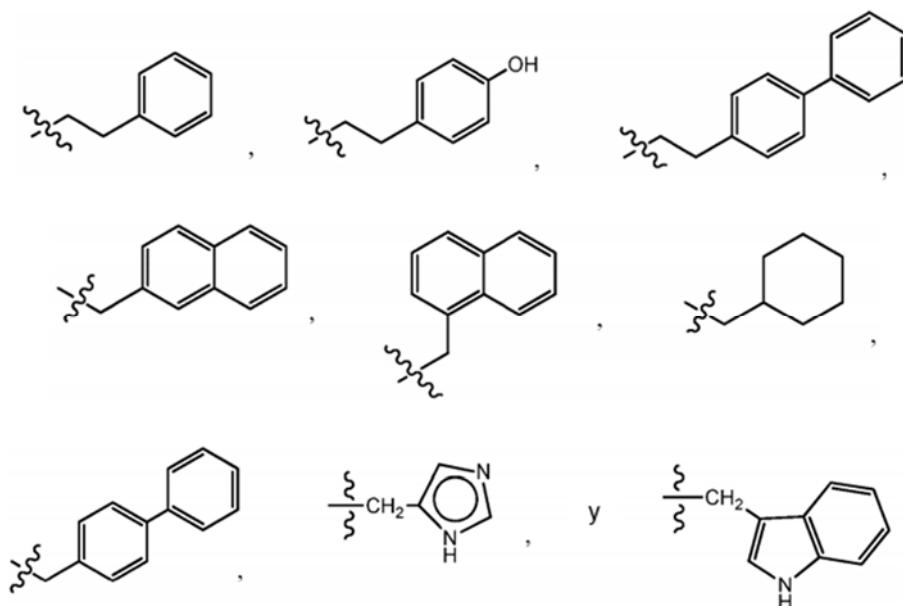
Las unidades de activación útiles pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor. En algunas formas de realización, la escisión de un enlace (ya sea a través de un grupo funcional intermedio o un enlace) entre la Unidad de Activación y la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora para iniciar la autoinmolación en la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es catalizada por la catepsina B, C o D, o una proteasa de plasmina.

En algunas formas de realización, la Unidad de Activación estará representada por $-(AA-)_{1-12}-$, o $-(AA-AA-)_{1-6}$ en donde AA se selecciona en cada caso independientemente de natural o no natural aminoácidos. En un aspecto, el AA se selecciona independientemente en cada aparición de aminoácidos naturales.

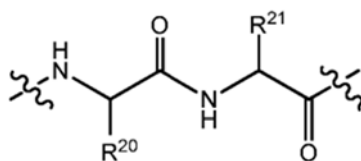
En algunas formas de realización, la Unidad de Activación tiene la Fórmula que se indica a continuación entre corchetes, la línea ondulada adyacente al carbonilo está unida a la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora y la otra línea ondulada está unida a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora (A) y/o una Unidad de Ramificación (B) intermedia, y el subíndice w es un número entero que va de 1 a 12:



donde R^{19} es, en cada caso, seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



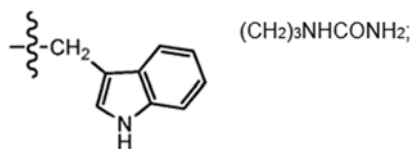
Las unidades de activación ilustrativas están representadas por las Fórmulas (XV), (XVI) y (XVII)



(XV)

donde R^{20} y R^{21} son como sigue:

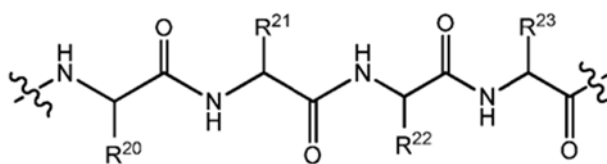
R^{20}	R^{21}
bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
metilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
bencilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
isobutilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-butilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;



bencilo	metilo; y
bencilo	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

donde R^{20} , R^{21} y R^{22} son como sigue:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
bencilo	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$; y
H	bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;

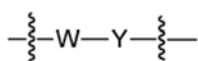


(XVII)

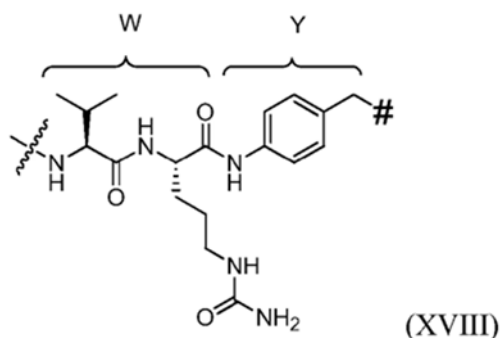
donde R^{20} , R^{21} , R^{22} y R^{23} son como sigue:

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	bencilo	Isobutilo	H; e
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo

En algunos de tales aspectos, el resto auto-inmolador X es

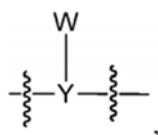


y se representa por estructura de Fórmula XVIII:



donde la línea ondulada indica unión covalente a la Unidad Estiradora Z (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de la Unidad Conectora (A) o la Unidad de Ramificación (B) o A y B, y la la marca de almohadilla (#) indica la unión covalente del carbono bencílico a la unidad de carbamato de metileno.

En otros aspectos, la autoinmolación se activa a partir de la escisión por una glucosidasa de una unidad de glucósido. La Unidad de glucósido es otro ejemplo de un resto auto-inmolador (X) en el que X tiene la estructura de -Y(W)- que se muestra a continuación,

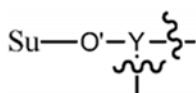


donde una línea ondulada indica unión covalente a la Unidad Estiradora Z (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de la Unidad Conectora (A) o la Unidad de Ramificación (B) o A y B, y la otra línea ondulada indica unión covalente al resto de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (es decir, una unidad de carbamato de metileno o MAC Unidad).

Una unidad de glucósido normalmente comprende un resto de azúcar (Su) unido a través de un enlace glucosídico de oxígeno a un espaciador auto-inmolador, Y, que tiene la estructura representada por -Y(W)-. La escisión del enlace glucosídico del oxígeno inicia la secuencia de reacción de autoinmolación que da como resultado la liberación del fármaco libre. En tales formas de realización, el resto de azúcar representa la Unidad de Activación cuando se une al espaciador auto-inmolador a través de un enlace escindible y la escisión de ese enlace inicia la secuencia de reacción de autoinmolación.

En algunos aspectos, el resto auto-inmolador activable (X) representado por -Y(W)- se activa a partir de la escisión por β -glucuronidasa de una unidad de glucurónido, que es una unidad de glucósido de ejemplo. La unidad de glucurónido comprende una Unidad de Activación y una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. La Unidad de glucurónido comprende un resto de azúcar (Su) unido a través de un enlace glucosídico de oxígeno a una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora. La escisión del enlace glucosídico del oxígeno inicia la secuencia de reacción de autoinmolación que da como resultado la liberación del fármaco libre. En tales formas de realización, el resto de azúcar representa la Unidad de Activación ya que está unida a la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora a través de un enlace escindible y la escisión de ese enlace inicia la secuencia de reacción de autoinmolación.

En algunas formas de realización, una Unidad de glucósido o Unidad de glucurónido comprende un resto de azúcar (Su) unido a través de un enlace de oxígeno glucosídico (-O'-) a una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y) de Fórmula:

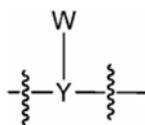


en la que las líneas onduladas indican unión covalente al carbamato de metileno y a la Unidad Estiradora (Z) o su precursor (Z'), ya sea directa o indirectamente a través de la Unidad Conectora o Unidad de Ramificación o Unidad Conectora y Unidad de Ramificación, según sea el caso.

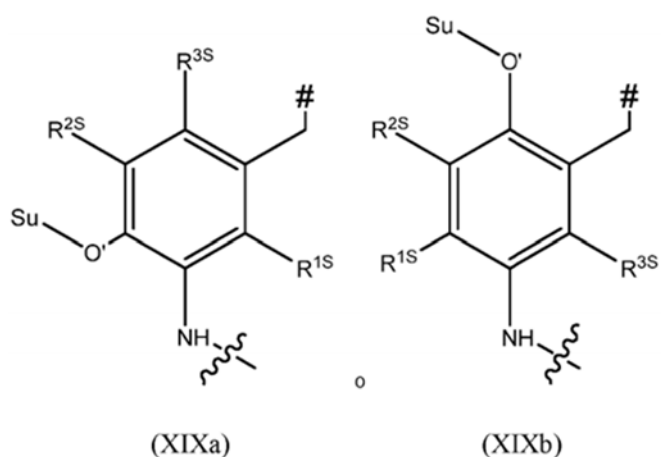
El enlace glucosídico de oxígeno (-O'-) es típicamente un sitio de escisión de β -glucuronidasa (es decir, Su es de glucurónido), tal como un enlace glucosídico escindible por β -glucuronidasa lisosomal humana.

El resto auto-inmolador X activable que tiene la estructura de

o



que es escindible por una glicosidasa para iniciar la secuencia de reacción auto-inmoladora puede representarse mediante la Fórmula XIXa o XIXb:



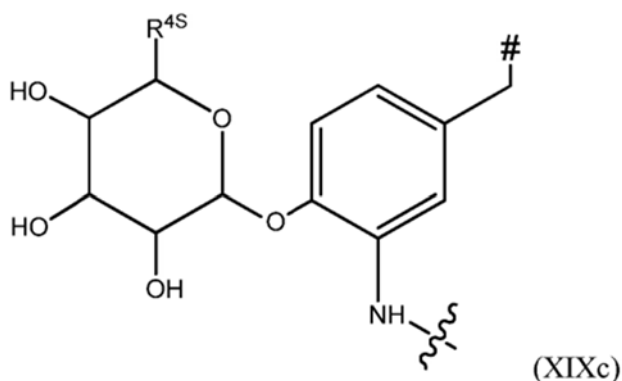
en la que Su es un resto de azúcar, -O'- representa un enlace glucosídico de oxígeno;

R^{1S} , R^{2S} y R^{3S} son independientemente hidrógeno, un halógeno, -CN, -NO₂ u otro grupo atractor de electrones, o un grupo donador de electrones; y

donde la línea ondulada indica unión a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor (Z')), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o Unidad de Ramificación o Unidad Conectora y Unidad de Ramificación); y # indica unión a la unidad de carbamato de metileno (ya sea directa o indirectamente a través de un grupo funcional intermedio u otro resto).

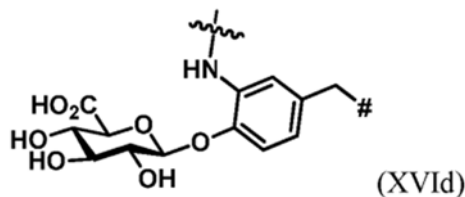
En formas de realización preferidas R^{1S} , R^{2S} y R^{3S} se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, -CN o -NO₂. En otras formas de realización preferidas, R^{1S} , R^{2S} y R^{3S} son cada uno hidrógeno. En otras formas de realización preferidas, R^{2S} es un grupo atractor de electrones, preferiblemente NO₂, y R^{1S} y R^{3S} son cada uno hidrógeno.

En algunos de estos aspectos, el grupo auto-inmolador activable capaz de dividirse con glicosidasa para iniciar la secuencia de reacción auto-inmoladora está representado por la Fórmula XIXc:



donde R^{4S} es CH₂OH o -CO₂H, la línea ondulada indica unión covalente a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o una Unidad de Ramificación o una Unidad Conectora y una Unidad de Ramificación, y la almohadilla (#) indica unión covalente a la unidad de carbamato de metileno.

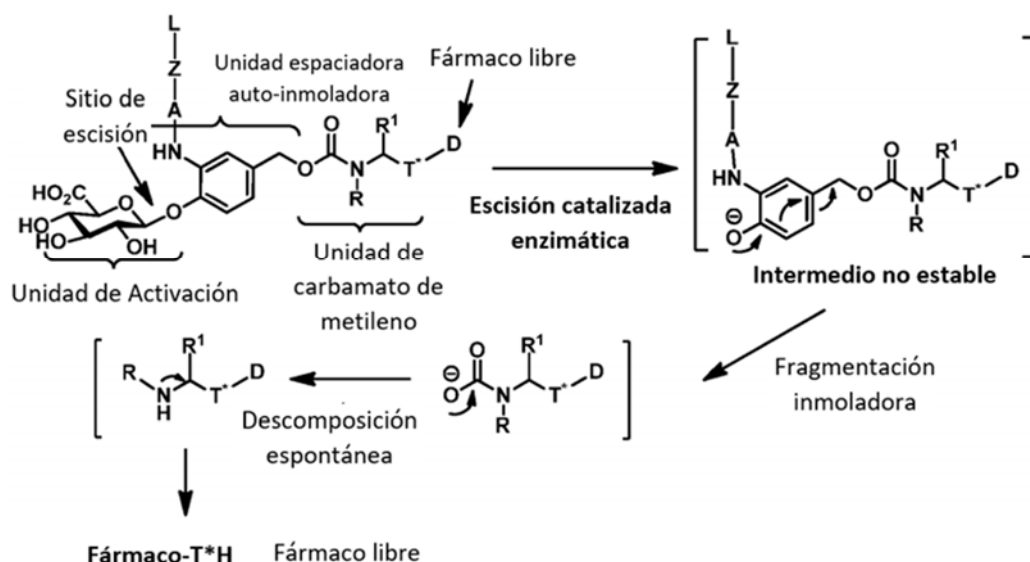
En algunas formas de realización en las que el resto auto-inmolador activable está compuesto por una Unidad de glucurónido, se representa mediante la siguiente Fórmula XVI d:



en la que la línea ondulada indica unión covalente a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o una Unidad de Ramificación o una Unidad Conectora y una Unidad de Ramificación, y la almohadilla (#) indica la unión covalente del carbono bencílico de Y a la unidad de carbamato de metileno.

Sin estar ligado a la teoría, el Esquema 1 representa un mecanismo de liberación de fármaco libre desde una Unidad de fármaco unida a una unidad de carbamato de metileno en un LDC que tiene un resto auto-inmolador con la estructura de -Y(W)- como en la Fórmula XVIId.

Esquema 1:



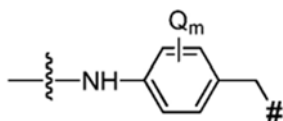
En algunas formas de realización, el evento de escisión que inicia una secuencia de reacción de autoinmolación es la escisión de un enlace disulfuro. En algunos de estos aspectos, un agente reductor (p. ej., glutatión-SH) actuará para escindir el enlace disulfuro iniciando así la secuencia de reacción de autoinmolación. Por consiguiente, en dichas formas de realización, la Unidad de Activación es un resto químico que contiene un átomo de azufre que participa en un enlace disulfuro escindible entre la Unidad de Activación y la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora.

Unidad Espaciadora auto-inmoladora (Y)

La Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es un resto químico que puede sufrir una secuencia de reacción de autoinmolación (es decir, fragmentación) que da como resultado la liberación de fármaco libre. Por lo general, son dos tipos de unidades espaciadoras auto-inmoladoras. El primero puede denominarse Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora en cascada electrónica. La cascada electrónica dentro de una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora de este tipo provoca una reacción de eliminación como consecuencia del desplazamiento de los pares electrónicos conjugados. Ese reordenamiento del par de electrones es seguido por la descomposición espontánea de la unidad de carbamato de metileno que finalmente conduce a la liberación de fármaco libre de la Unidad de Fármaco. La activación de la Unidad de Activación inicia la reacción de eliminación (p. ej., reacción de eliminación 1,6 o 1,4). El segundo tipo de Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora de ciclación. La Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora de ciclación actúa provocando la descomposición espontánea de una unidad de carbamato de metileno después de una reacción de ciclación intramolecular, lo que conduce a la liberación libre del fármaco. La activación de la Unidad de Activación inicia la reacción de ciclación. En consecuencia, la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es un resto químico que es capaz de sufrir una reacción de fragmentación o ciclación después de la activación de la Unidad de Activación, por lo que la reacción de fragmentación o ciclación da como resultado la descomposición espontánea de la unidad de carbamato de metileno y la liberación de fármaco libre.

En algunos aspectos, una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es un resto químico que es capaz de unir covalentemente

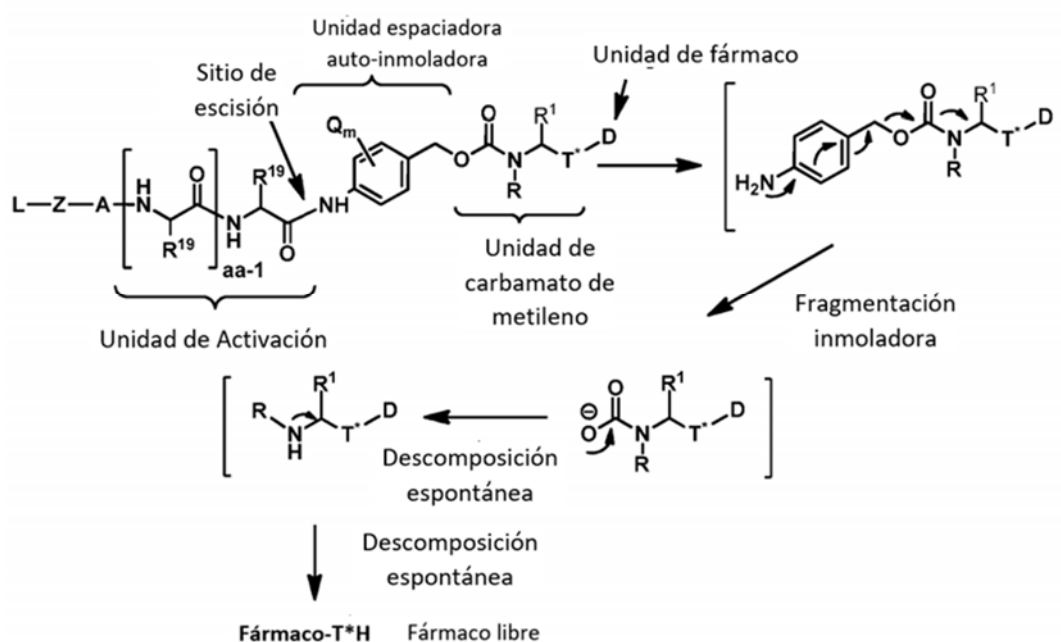
tres restos químicos espacialmente distintos (p. ej., una Unidad de Activación (W), una unidad de carbamato de metileno y una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o una Unidad de Ramificación, o una Unidad Conectora y una Unidad de Ramificación. En otros aspectos, una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora es un resto químico que es capaz de unir covalentemente fracciones químicas espacialmente distintas (p. ej., una Unidad de Activación y una unidad de carbamato de metileno) en las que la unión a una Unidad Estiradora se realiza a través de la Unidad de Activación.:



donde la línea ondulada indica unión covalente a la Unidad de Activación y el hashtag (#) indica unión covalente del carbono bencílico del grupo PAB a la unidad de carbamato de metileno, Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), u otro grupo donador de electrones, -halógeno, -nitro o -ciano u otro grupo atractor de electrones (preferiblemente, Q es -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), halógeno, nitro o ciano); y el subíndice m es un número entero que oscila entre 0 y 4 (es decir, el arileno central no tiene otros sustituyentes o tiene entre 1 y 4 sustituyentes). En formas de realización preferidas, el subíndice m es 0. En otras formas de realización preferidas, el subíndice m es 1 o 2 y cada Q es un grupo donador de electrones seleccionado independientemente.

El esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de fármaco libre por un grupo PAB ejemplar de una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y) que está unida directamente a -D a través de una unidad de carbamato de metileno, donde el resto auto-inmolador tiene la estructura de -W-Y-.

Esquema 2



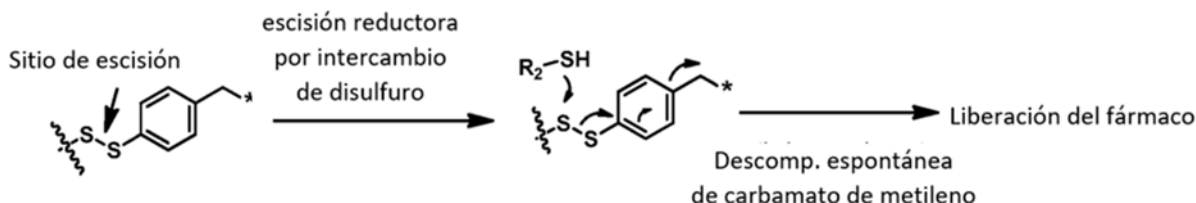
donde Q es -alquilo C₁-C₈ o -O-(alquilo C₁-C₈) u otro grupo donador de electrones, o -halógeno, - nitro, -ciano u otro grupo sustractor de electrones (Q es preferiblemente alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), halógeno, nitro o ciano); y el subíndice m es un número entero que oscila entre 0 y 4; y R¹⁹, seleccionados independientemente, y el subíndice aa son como se definen para las Unidades de Activación basadas en péptidos

Otros ejemplos de Unidades Espaciadoras auto-inmoladoras incluyen, pero no se limitan a compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase, por ejemplo, Hay et al., 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales, así como heterociclos de cinco anillos y amonio cuaternario N-heterocíclico sales. También se pueden usar unidades espaciadoras autoinmolantes que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (véase, por ejemplo, Rodrigues et al., 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] (ver, por ejemplo, Storm et al., 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) Amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (ver, por ejemplo, Amsberry et al., 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867), y espaciadores basados en bloqueo de trimetilo. La eliminación de fármacos que contienen amina que se sustituyen en la posición α de la glicina (véase, por ejemplo, Kingsbury et al., 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) también son ejemplos de unidades espaciadoras auto-inmoladoras útiles

en la Conjugados de fármaco ligando como son los tiofenoles. (ver, por ejemplo, Senter, P et al., 1990, J. Org. Chem. 55:2975).

Las Unidades espaciadoras auto-inmoladoras ejemplares incluyen, además, por ejemplo, un tiofenilo, cuyo sulfuro de sulfhidrilo participa en un enlace disulfuro desde el cual se libera el fármaco libre como se muestra a continuación en el Esquema 3:

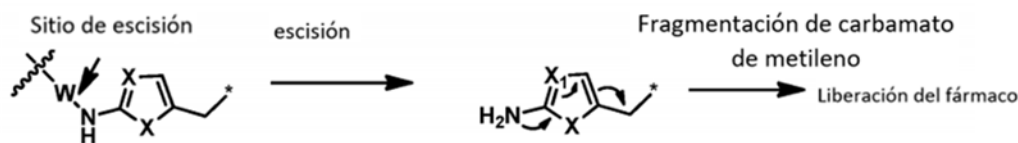
Esquema 3



donde la línea ondulada indica el sitio de unión a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o Unidad de Ramificación o Unidad Conectora y Unidad de Ramificación, y el asterisco (*) indica el sitio de unión del carbono bencílico de Y a la unidad de carbamato de metileno.

Las unidades espaciadoras auto-inmoladoras de ejemplo incluyen, además, por ejemplo, un heterociclo de 5 anillos que libera el fármaco como se muestra a continuación en el Esquema 4.

Esquema 4:



donde X es C, O o S, W es una Unidad de Activación, la línea ondulada indica el sitio de unión a una Unidad Estiradora (Z) (o su precursor Z'), ya sea directa o indirectamente a través de una Unidad Conectora o Unidad de Ramificación o Unidad Conectora y Unidad de Ramificación, y el asterisco indica el sitio de unión a la unidad de carbamato de metileno.

En algunos aspectos de la invención preventiva, la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora tiene una masa de no más de aproximadamente 1000 dalton, no más de aproximadamente 500 dalton, no más de aproximadamente 400 dalton, no más de aproximadamente 300 dalton, o de aproximadamente 10, 50 o 100 a aproximadamente 1000 daltons, de aproximadamente 10, 50 o 100 a aproximadamente 500 daltons, de aproximadamente 10, 50 o 100 daltons a aproximadamente 400 daltons, de aproximadamente 10, 50 o 100 daltons a aproximadamente 300 daltons o de aproximadamente de unos 10, 50 o 100 daltons a unos 200 daltons.

Subíndice "p"

En un aspecto de la invención, el subíndice p representa el número de fracciones conectoras de fármaco en una Unidad de Ligando de un conjugado de fármaco y ligando individual (LDC) y es un número entero que varía preferiblemente de 1 a 16, 1 a 12, 1 a 10 o 1 a 8. Los LDC individuales también pueden denominarse compuestos LDC. En cualquiera de las formas de realización del presente documento, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 restos enlazadores de fármacos conjugados con una Unidad de Ligando. de un compuesto LDC individual. En otro aspecto de la invención, un grupo de formas de realización describe una población de compuestos conjugados de fármaco y ligando individuales sustancialmente idénticos excepto por el número de restos enlazadores de fármaco unidos a cada Unidad de Ligando (es decir, una composición de LDC) de modo que el subíndice p representa el número medio de restos enlazadores de fármacos unidos a las Unidades de Ligando de la composición de LDC. En ese grupo de formas de realización, el subíndice p es un número que va de 1 a 16, de 1 a 12, de 1 a 10, o de 1 a 8, de 2 a 16, de 2 a 12, de 2 a 10, o de 2 a aproximadamente 8. En algunos aspectos, el valor de p se refiere a la carga media de fármaco, así como a la carga de fármaco del ADC predominante en la composición.

En algunos aspectos, la conjugación será a través de los disulfuros intercatenarios y habrá de 1 a aproximadamente 8 restos enlazadores de fármacos conjugados con una molécula de ligando. En algunos aspectos, la conjugación será a través de un residuo de cisteína introducido, así como disulfuros intercatenarios y habrá de 1 a 10 o de 1 a 12 o de 1 a 14 o de 1 a 16 restos enlazadores de fármaco conjugados a una Unidad de Ligando. En algunos aspectos, la conjugación será a través de un residuo de cisteína introducido y habrá 2 o 4 restos enlazadores de fármaco conjugados a una Unidad de Ligando.

Mezclas y composiciones de conjugados de ligando-fármaco

La presente invención proporciona mezclas de conjugados de ligando-fármaco y composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los conjugados de ligando-fármaco descritos en el presente documento. Las mezclas y composiciones farmacéuticas comprenden una pluralidad de conjugados. En algunos aspectos, cada uno de los conjugados en la mezcla o composición es idéntico o sustancialmente idéntico, sin embargo, la distribución de enlazadores de fármacos en los ligandos en la mezcla o composiciones puede variar, así como la carga de fármacos. Por ejemplo, la tecnología de conjugación utilizada para conjugar fracciones enlazadoras de fármacos con anticuerpos como ligando de direccionamiento puede dar como resultado una composición o mezcla heterogénea con respecto a la distribución de enlazadores de fármacos en las Unidades de ligando de anticuerpo dentro de la mezcla y/o composición y/o con respecto a la carga de enlazadores de fármacos en las moléculas de ligando dentro de la mezcla y/o composición. En algunos aspectos, la carga de enlazadores de fármacos en cada una de las moléculas de anticuerpo en una mezcla o composición de tales moléculas es un número entero que oscila entre 1 y 14.

En esos aspectos, cuando se hace referencia a la composición como un todo, la carga de fracciones conectoras de fármacos es un número que oscila entre 1 y aproximadamente 14. Dentro de la composición o mezcla, también puede haber un pequeño porcentaje de anticuerpos no conjugados. El número medio de fracciones enlazadoras de fármaco por Unidad de Ligando en la mezcla o composición (es decir, la carga media de fármaco) es un atributo importante ya que determina la cantidad máxima de fármaco que puede administrarse a la célula diana. Cuando las Unidades Enlazadoras en un LDC no están ramificadas, el número promedio de fracciones enlazadoras de fármacos en una mezcla o composición de dichos LDC representa la carga promedio de fármacos y es un número que puede variar de 1 a 14, preferiblemente de 2 a aproximadamente 10 o alrededor de 8. La carga promedio de droga puede ser 1, 2 o alrededor de 2, 3 o alrededor de 3, 4 o alrededor de 4, 5 o alrededor de 5, 6 o aproximadamente 6, 7 o aproximadamente 7, 8 o aproximadamente 8, 9 o aproximadamente 9, 10 o aproximadamente 10, 11 o aproximadamente 11, 12 o aproximadamente 12, 13 o alrededor de 13, 14 o alrededor de 14, 15 o alrededor de 15, 16 o alrededor de 16. Cuando las Unidades Enlazadoras en un LDC están ramificadas, el número promedio de restos enlazadores de fármacos en mezclas o composiciones de tales LDC tienen rangos correspondientes a LDC no ramificados, pero la carga promedio de fármaco será un múltiplo de esas cargas promedio de restos enlazadores de fármaco dependiendo del número de puntos de ramificación en cada Unidad Enlazadora.

En algunos aspectos, las mezclas y composiciones farmacéuticas comprenden una pluralidad (es decir, una población) de compuestos conjugados, sin embargo, los compuestos conjugados son idénticos o sustancialmente idénticos y son sustancialmente homogéneos con respecto a la distribución de fracciones enlazadoras de fármacos en el ligando. Unidades dentro de la mezcla y/o composición y con respecto a la carga de restos enlazadores de fármacos en las Unidades de Ligando dentro de la mezcla y/o composición. En algunos de estos aspectos, la carga de fracciones enlazadoras de fármacos en la Unidad de Ligando de anticuerpo es 2 o 4. Dentro de la composición o mezcla, también puede haber un pequeño porcentaje de anticuerpos no conjugados. La carga media de fármaco en dichas formas de realización es de aproximadamente 2 o aproximadamente 4. Típicamente, tales composiciones y mezclas resultan del uso de técnicas de conjugación específicas del sitio y de la conjugación con un residuo de cisteína introducido.

El número promedio de Unidades de Fármaco o fracciones enlazadoras de fármaco por Unidad de Ligando en una preparación de una reacción de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectrometría de masas, ensayo ELISA, HPLC (p. ej., HIC). También se puede determinar la distribución cuantitativa de los compuestos del Conjugado Ligando-Fármaco en términos del subíndice p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de compuestos homogéneos de conjugados de ligando-fármaco se pueden lograr por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

En algunos aspectos, las composiciones son composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de conjugados de ligando-fármaco descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algún aspecto, la composición farmacéutica estará en forma líquida. En algunos aspectos, será un polvo liofilizado.

Las composiciones, incluidas las composiciones farmacéuticas, se pueden proporcionar en forma purificada. Como se usa en el presente documento, "purificado" significa que cuando se aísla, el aislado contiene al menos el 95 %, y en otro aspecto al menos el 98 %, de conjugado en peso del aislado.

Métodos de uso

Tratamiento del cáncer

Los conjugados ligando-fármaco son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, provocando la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los conjugados de ligando-fármaco se pueden usar en consecuencia en una variedad de entornos para el tratamiento de cánceres. Los conjugados de ligando-fármaco se pueden usar para administrar un fármaco a una célula tumoral o a una célula cancerosa. Sin estar ligado a la teoría, la Unidad de Ligando de un conjugado de ligando y fármaco puede unirse o asociarse con una célula cancerosa o un antígeno asociado a una célula tumoral, y el conjugado de ligando y fármaco puede absorberse (internalizarse) dentro del tumor. celular o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por

receptor u otro mecanismo de internalización. El antígeno se puede unir a una célula tumoral o a una célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o a la célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, mediante la activación de la Unidad de Activación, el fármaco se libera dentro de la célula. Alternativamente, el fármaco libre puede liberarse del Conjugado Ligando-Fármaco fuera de la célula tumoral o de la célula cancerosa, y el fármaco libre puede penetrar posteriormente en la célula.

La Unidad de Ligando puede unirse a la célula tumoral o a la célula cancerosa.

La Unidad de Ligando puede unirse a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que está en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

La Unidad de Ligando puede unirse a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa que es una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

La especificidad de la Unidad de Ligando para una célula tumoral o célula cancerosa en particular puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan con mayor eficacia. Por ejemplo, los conjugados de ligando-fármaco que se dirigen a un antígeno de célula cancerosa presente en cánceres hematopoyéticos pueden ser útiles para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas (p. ej., anti-CD30, anti-CD70, anti-CD19, Unidad de Ligando de unión anti-CD33 (p. ser útil para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas). Los conjugados de ligando y fármaco que se dirigen a un antígeno de célula cancerosa presente en tumores sólidos pueden ser útiles para tratar dichos tumores sólidos.

Los cánceres que se pueden tratar con un conjugado de ligando-fármaco incluyen, entre otros, cánceres hematopoyéticos tales como, por ejemplo, linfomas (linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin) y leucemias y tumores sólidos. Los ejemplos de cánceres hematopoyéticos incluyen linfoma folicular, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células del manto, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes y mieloma múltiple. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Terapia multimodal para el cáncer

Los cánceres, incluidos, entre otros, un tumor, metástasis u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular descontrolado, pueden tratarse o inhibirse mediante la administración de un conjugado de ligando-fármaco.

Se proporcionan métodos para tratar el cáncer, incluida la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado de ligando-fármaco y un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser aquel con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea refractario, o el agente quimioterapéutico puede ser aquel con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es refractario. Los Conjugados Ligando-Fármaco se pueden administrar a un paciente que también se ha sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer.

El paciente también recibe un tratamiento adicional, tal como radioterapia. El conjugado de ligando-fármaco se puede administrar simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. El agente quimioterapéutico o la radioterapia pueden administrarse antes o después de la administración de un conjugado de ligando-fármaco.

Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Puede administrarse uno cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos, tales como uno o más agentes quimioterapéuticos estándar de atención.

Los métodos de tratamiento del cáncer con un conjugado de ligando-fármaco pueden proporcionar una alternativa a la quimioterapia o la radioterapia cuando la quimioterapia o la radioterapia han demostrado o pueden resultar demasiado tóxicas, por ejemplo, dan como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El paciente en tratamiento puede, opcionalmente, ser tratado con otro tratamiento contra el cáncer, como cirugía, radioterapia o quimioterapia, según el tratamiento que se considere aceptable o soportable.

Tratamiento de enfermedades autoinmunes

Los conjugados de ligando-fármaco son útiles para matar o inhibir la replicación no deseada de células que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Los Conjugados Ligando-Fármaco se pueden usar en consecuencia en una variedad de escenarios para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los conjugados de ligando-fármaco se pueden usar para administrar un fármaco a una célula diana. Sin estar ligado a ninguna teoría, el conjugado de fármaco-ligando puede asociarse con un antígeno en la superficie de una célula inmunitaria proinflamatoria o inapropiadamente estimulada, y el conjugado de fármaco-ligando puede entonces incorporarse dentro de la célula diana a través de un receptor mediado. endocitosis. Una vez dentro de la célula, la unidad Linker se escinde, lo que da como resultado la liberación del fármaco o unidad de fármaco. El fármaco liberado queda entonces libre para migrar en el citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. Alternativamente, el fármaco puede escindirse del conjugado ligando-fármaco fuera de la célula diana, y el fármaco o la unidad de fármaco penetran posteriormente en la célula.

La Unidad de Ligando puede unirse a un antígeno autoinmune. El antígeno puede estar en la superficie de una célula involucrada en una condición autoinmune.

La Unidad de Ligando puede unirse a linfocitos activados que están asociados con el estado de enfermedad autoinmune.

El conjugado de ligando-fármaco puede matar o inhibir la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado con una enfermedad autoinmune particular.

Los tipos particulares de enfermedades autoinmunes que se pueden tratar con los conjugados de ligando-fármaco incluyen, entre otros, trastornos relacionados con los linfocitos Th2 (p. ej., dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto contra huésped); trastornos relacionados con los linfocitos Th1 (p. ej., artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener y tuberculosis); y trastornos relacionados con los linfocitos B activados (p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I).

Terapia multifarmacológica de enfermedades autoinmunes

También se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un conjugado de ligando-fármaco y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

Composiciones y métodos de administración

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados ligando-fármaco descritos en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los conjugados de ligando-fármaco pueden estar en cualquier forma que permita que el compuesto se administre a un paciente para el tratamiento de un trastorno asociado con la expresión del antígeno al que se une la Unidad de Ligando. Por ejemplo, los conjugados pueden estar en forma de líquido o sólido.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para permitir que un compuesto esté biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden adoptar la forma de una o más unidades de dosificación.

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para los expertos en la técnica que la dosificación óptima del ingrediente o ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (p. ej., humano), la forma particular del compuesto, la forma de administración y la composición empleada.

La composición puede estar, por ejemplo, en forma líquida. El líquido puede ser útil para la administración por inyección. En una composición para administración por inyección, también se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como aminoácidos, acetatos, citratos o fosfatos; detergentes, tales como tensioactivos no iónicos, polioles; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede estar contenida en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante ejemplar. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

La cantidad del conjugado que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que emplear en las composiciones también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es al menos aproximadamente el 0,01 % de un compuesto en peso de la composición.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un conjugado de ligando y fármaco por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un conjugado de ligando-fármaco por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto. Dependiendo del fármaco utilizado, la dosis puede ser aún menor, por ejemplo, 1,0 µg/kg a 5,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 2,0 mg/kg o 1,0 mg/kg, o 1,0 µg/kg a 500,0 µg/kg del peso corporal del sujeto.

En general, la dosificación de un conjugado administrado a un paciente es normalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del sujeto o de 1,0 mg/kg a 5,0 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosis administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosificación administrada está entre alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg o alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas formas de realización, la dosificación administrada es de aproximadamente 0,1 a 4 mg/kg, incluso más preferiblemente de 0,1 a 3,2 mg/kg, o incluso más preferiblemente de 0,1 a 2,7 mg/kg del peso corporal del sujeto durante un ciclo de tratamiento.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. Los vehículos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una forma de realización, cuando se administra a un paciente, el compuesto o las composiciones y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles.

El agua es un vehículo ejemplar cuando los compuestos se administran por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH.

Los conjugados se pueden formular de acuerdo con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, particularmente seres humanos. Normalmente, los portadores o vehículos para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local como la lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o sobre, que indica la cantidad de agente activo. Cuando se va a administrar un conjugado por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando el conjugado se administre por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se mezclen antes de la administración.

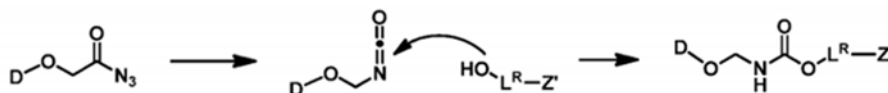
Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en pleno cumplimiento de todas las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.

Métodos para preparar conjugados de fármaco-ligando

Los conjugados de fármaco-ligando descritos en este documento se pueden preparar en una construcción en serie de anticuerpos, enlazadores y fármacos, o de forma convergente ensamblando porciones seguidas de un paso de ensamblaje completo. Se puede usar el reordenamiento de Curtius o una síntesis de cloramina para proporcionar un

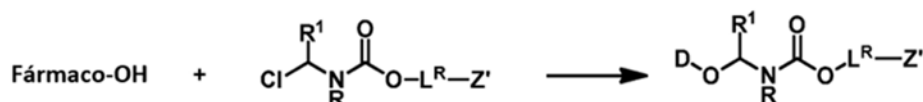
conector de carbamato de metileno que es una característica común de todos los conjugados descritos en el presente documento.

Esquema 5: Preparación de fármaco-enlazadores ejemplares utilizando la reacción de reordenamiento de Curtius:

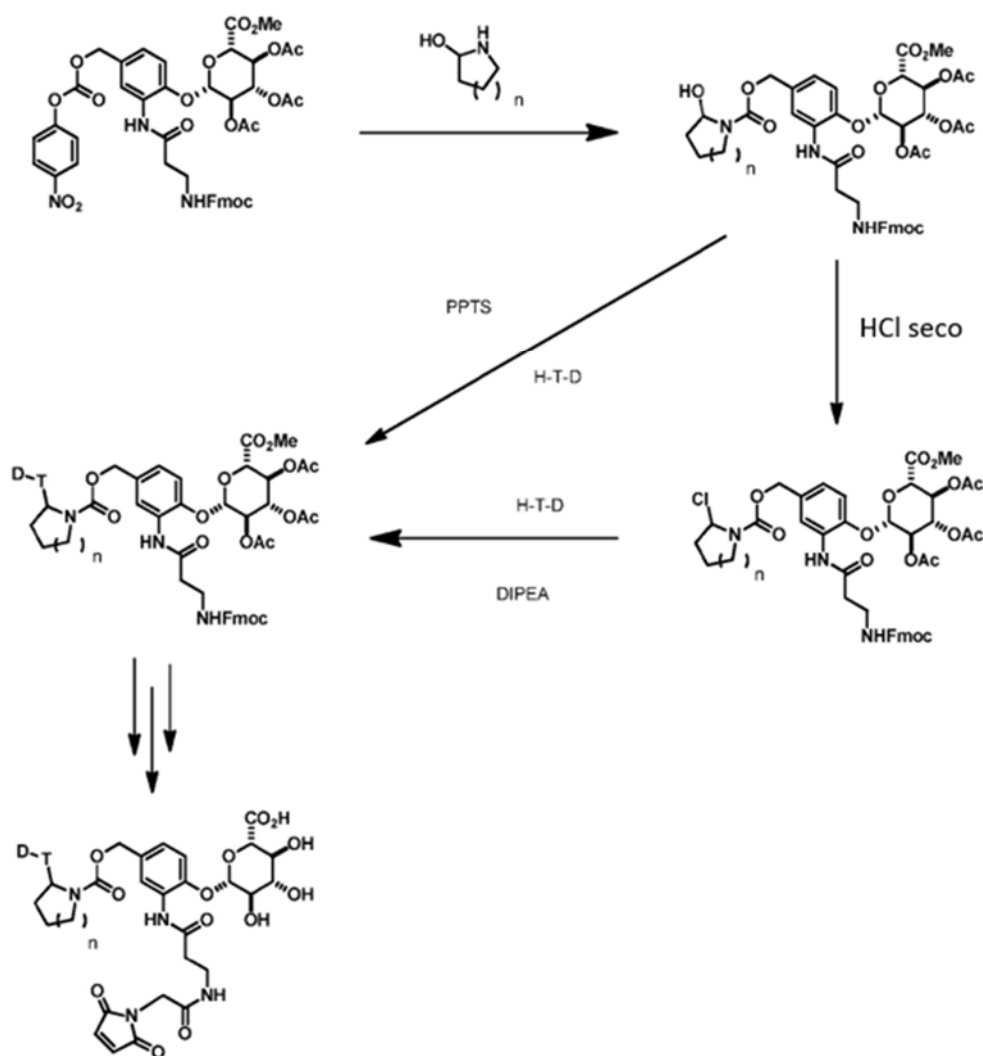


El esquema 5 ilustra una estrategia sintética que implica un reordenamiento de Curtius de un derivado de acil azida del fármaco libre, en el que D es una unidad de fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo átomo de hidrógeno se incorpora a la unidad de carbamato de alcoxi de metileno formada como consecuencia de la transposición, Z' es un precursor de la Unidad Estiradora y L^R es el resto de la Unidad Enlazadora (p. ej., -Y(W)-A o -Y-W-A-, en la que Y está unido al átomo de oxígeno del carbamato y A está unido a Z'). Esa estrategia puede aplicarse a fármacos que contengan múltiples alcoholes u otros heteroátomos, como un medio para adquirir regioselectividad, ya que existen muchos métodos complementarios de alquilación para formar una acil azida, tales como: alquilación de haloéster, alquilación de haloácido o inserción de carbeno metálico con diazoacetato de etilo o metilo, véase Doyle, M. et al. *Modern Catalytic Methods for Organic Synthesis with Diazo Compounds*; Wiley: Nueva York, 1998. A continuación, la acil azida se calienta con al menos una cantidad estequiométrica de un intermedio de Unidad Enlazadora que contiene alcohol, tal como la estructura 1,1. (ver ejemplos).

Esquema 6: Preparación de compuestos de fármaco-enlazadores ejemplares a través de la síntesis de N-clorometilamina:



La síntesis de N-clorometilamina es una alternativa al reordenamiento de Curtius porque permite la introducción de un alcohol no modificado u otro fármaco que contiene heteroátomos, cuyo uso puede no ser compatible con las condiciones requeridas para formar la acil azida de Esquema 5, y procede por condensación con una N-clorometilamina reactiva como la estructura 1,5 (véanse los ejemplos).



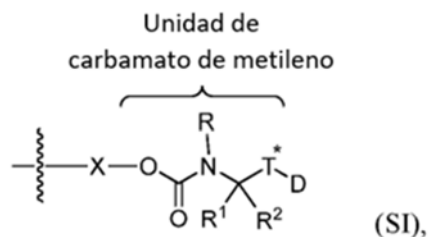
Para compuestos enlazadores de fármacos y conjugados de fármacos ligandos que tienen una unidad carbamato de metileno en la que T* es el heteroátomo de nitrógeno de una amina alifática primaria o el heteroátomo sustituido de una alquilación directa alifática secundaria (cíclica o acíclica) con una clorometilamina siguiendo los procedimientos generalizados proporcionados por el Esquema 6 o el Esquema 7 puede no ser adecuada debido a la sobrealquilación excesiva o no deseada del heteroátomo de nitrógeno del grupo funcional amina del fármaco libre. En esos casos, se puede usar el método incorporado por el Esquema 8.

Esquema 8.

Formas de realización numeradas

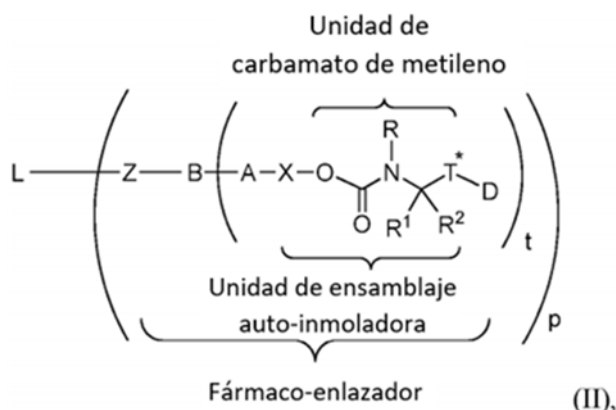
Las siguientes formas de realización ejemplifican adicionalmente la invención y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

1. Un compuesto conjugado de ligando-fármaco que comprende una Unidad de Ligando, una unidad de fármaco y una Unidad Enlazadora, en el que la Unidad Enlazadora se compone de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora (SI) que tiene una unidad de carbamato de metileno y un resto auto-inmolador activable en el que la unidad de carbamato de metileno está unida covalentemente a la Unidad de Fármaco, y donde la Unidad de Ensamblaje SI unida covalentemente a la Unidad de Fármaco está representada por la estructura de Fórmula SI:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la línea ondulada indica unión covalente al resto de la Unidad Enlazadora; D es la Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno; T* es el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno indicada; X es el resto auto-inmolador activable; R, R¹ y R² son hidrógeno.

2. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 1 que tiene la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que L es una Unidad de Ligando; Z es una Unidad Estiradora; B es una Unidad de Ramificación opcional y está presente cuando t es mayor que 1 y está ausente cuando t es 1; A es una Unidad Conectora opcional; el subíndice t va de 1 a 4; y el subíndice p es un número entero que va de 1 a 16.

3. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 1 a 2 en el que D es una unidad de fármaco correspondiente a un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado en la unidad de carbamato de metileno de modo que T* representa el heteroátomo de oxígeno de ese grupo funcional.

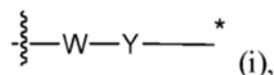
4. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 3, en el que D es una unidad de fármaco correspondiente a un fármaco que contiene alcohol alifático, en el que la unión de D dentro del conjugado se realiza a través del heteroátomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del alcohol alifático, de modo que T* representa el átomo de oxígeno de ese grupo funcional.

5. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 3, en el que D es una unidad de fármaco correspondiente a un fármaco que contiene alcohol aromático, en el que la unión de D dentro del conjugado se realiza a través del átomo de oxígeno del alcohol aromático, de modo que T* representa el oxígeno átomo de ese grupo funcional.

6. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 3, en el que el alcohol aromático no es un alcohol fenólico.

7. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 6 en el que B está ausente y el subíndice t es 1.

8. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 7 en el que la estructura que representa el componente activable indicado el resto auto-inmolador (X) dentro de la Unidad Enlazadora está representado por la Fórmula (i)



en la que la línea indica la unión covalente de W a A, B o Z dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B y el asterisco (*) indica unión covalente de Y a una unidad de carbamato de metileno y en donde; W es una Unidad de Activación; e Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora, en la que la activación de la autoinmolación de Y da como resultado la liberación de fármaco libre.

9. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 8 en el que la activación para la autoinmolación de Y se realiza mediante la escisión enzimática de un enlace covalente entre W e Y.

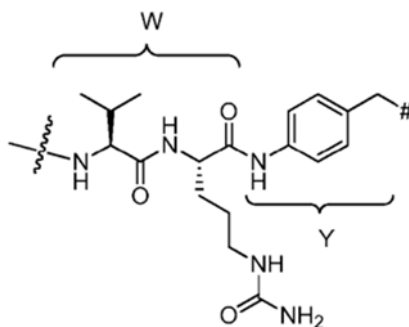
10. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 9, en el que la escisión enzimática se realiza mediante una proteasa asociada a un tumor.

11. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 10 en el que la proteasa asociada al tumor es

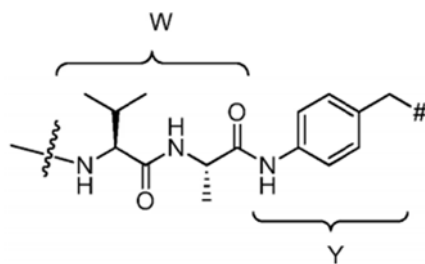
cathepsina B.

12. El compuesto conjugado ligando-fármaco de las formas de realización 10 en el que W es -Val-Cit-, -Phe-Lys- o -Val-Ala-.

13. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 10 en el que -W-Y- está representado por la estructura de:

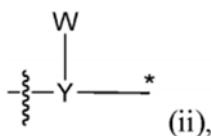


O



en el que el enlace ondulado al átomo de nitrógeno de W indica un enlace covalente a Z, A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y la almohadilla (#) indica unión covalente del carbono bencílico de Y a una unidad de carbamato de metileno.

14. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 7, en el que la estructura que representa el resto auto-inmolador activable indicado (X) dentro de la Unidad Enlazadora está representada por la Fórmula (ii):

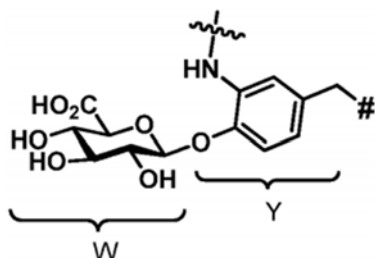


en la que la línea ondulada indica la unión covalente de Y a A, B o Z dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y el asterisco (*) indica unión covalente de Y al resto carbamato de metileno, y donde; W es una Unidad de Activación; e Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora, en la que la activación de la autoinmolación de Y da como resultado la liberación de fármaco libre.

15. El compuesto conjugado de ligando-fármaco de la forma de realización 14, en el que la activación para la autoinmolación de Y es mediante la escisión enzimática de un enlace covalente entre W e Y, en el que la escisión enzimática es mediante una glucosidasa.

17. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 15, en el que W es un resto de azúcar conectado a Y a través de un enlace glucosídico capaz de escindirse mediante una glucosidasa para la activación de la autoinmolación de Y.

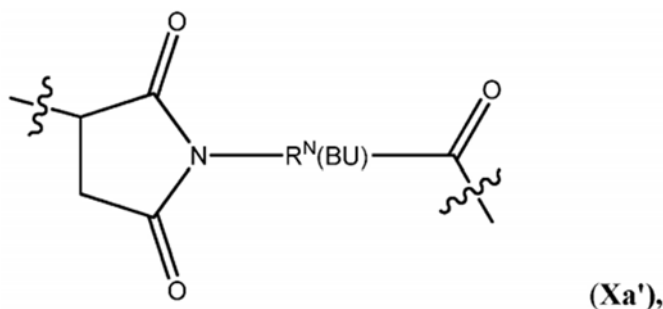
18. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 13 donde -Y(W)- está representado por la estructura de:



donde el enlace ondulado adyacente al átomo de nitrógeno de Y indica unión covalente de Y a Z, A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y la marca de almohadilla (#) indica unión covalente del átomo de carbono bencílico de Y a una unidad de carbamato de metileno.

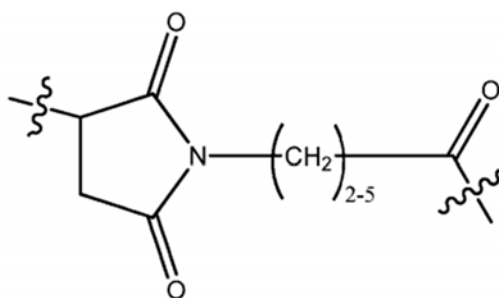
19. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 18, en el que la unidad extensora (Z) comprende un resto succinimida o un resto ácido-amida, en el que ese resto está unido a un átomo de azufre de la unidad ligando.

20. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 19, en el que la Unidad Estiradora (Z) está compuesta por un resto de succinimida y está representada por la estructura de Fórmula Xa':



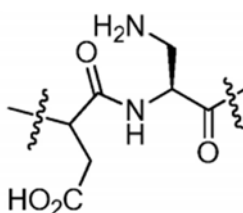
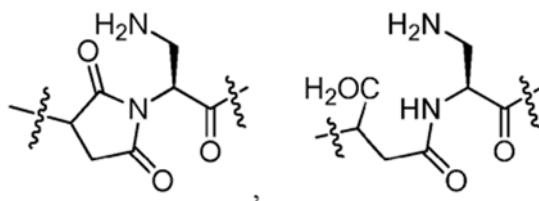
en la que la línea ondulada adyacente al sistema de anillo de succinimida indica unión covalente a un átomo de azufre de una Unidad de Ligando; la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión dentro del enlazador; y R^N es -alquileo C_2-C_5 , en el que el alquileo está opcionalmente sustituido por una Unidad Básica (UB), en la que UB es $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^{op}$, o $-(CH_2)_xN(R^{op})_2$, en el que el subíndice x es un número entero que oscila entre 1 y 4; y R^{op} es alquilo C_{1-6} .

21. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 19, en el que la Unidad Estiradora (Z) está compuesta por un resto de succinimida y está representada por la estructura:



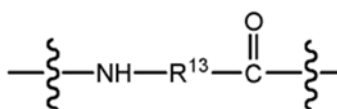
en la que la línea ondulada adyacente al sistema de anillo de succinimida indica unión covalente a un átomo de azufre de un Ligand Unit, y la línea ondulada adyacente al átomo de carbono del carbonilo indica la unión dentro del enlazador.

22. El compuesto conjugado de ligando-fármaco de la forma de realización 19, en el que la Unidad Estiradora (Z) está compuesta por un resto de succinimida o un resto de ácido-amida y está representado por la estructura de:



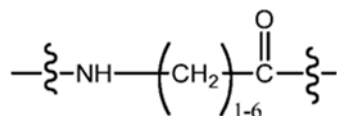
23. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 21 en el que está presente una Unidad Conectora (A).

24. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 23 en el que A es;



en el que la línea ondulada adyacente al átomo de carbono del carbonilo indica la unión covalente al resto auto-inmolador activable X de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, y la otra línea ondulada indica la unión a B, si está presente, o a Z si B está ausente; y R^{13} es -alquileo C₁-C₆-, -carbociclo C₃-C₈-, -arileno-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-.

25. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la forma de realización 24 en el que A tiene la Fórmula



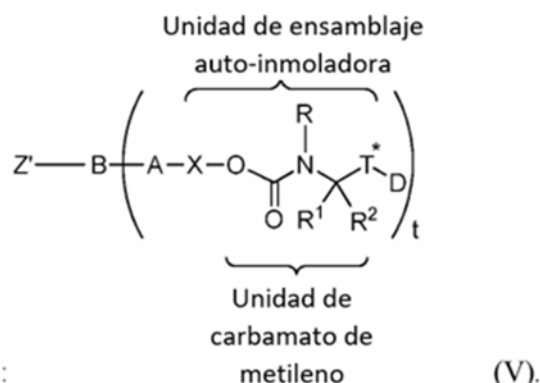
26. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 22 en la que A está ausente.

27. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 26, en el que el subíndice p oscila entre 1 y 10.

28. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 2 a 26, en el que el subíndice p oscila entre 1 y 8.

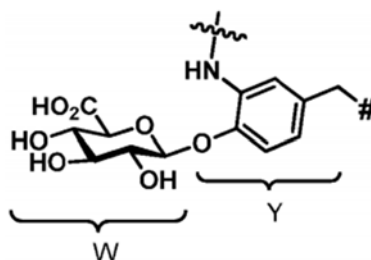
29. El compuesto conjugado de ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 1 a 28, en el que la Unidad de Ligando corresponde a un anticuerpo dirigido.

30. Un compuesto de Fármaco-Enlazador, en el que el compuesto comprende una unidad de fármaco y una Unidad de Enlazadora, en el que la Unidad de Enlazadora se compone de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno y un resto auto-inmolador activable en el que la unidad de fármaco está unida covalentemente a la unidad de carbamato de metileno, donde el compuesto de fármaco-enlazador tiene la estructura de Fórmula V



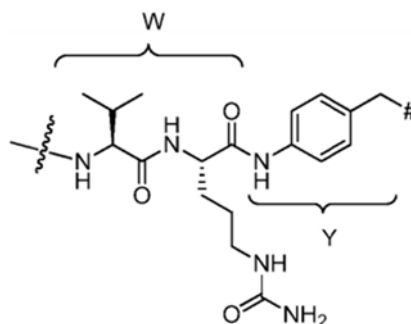
, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; donde D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno indicada; T* es el átomo de oxígeno de dicho grupo funcional que se incorpora a la unidad de carbamato de metileno indicada; R, R¹ y R² son hidrógeno; X es un resto auto-inmolador activable; Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a Z; B es una Unidad de Ramificación opcional que está presente cuando el subíndice t es mayor que 1 y está ausente cuando t es 1; A es una Unidad Conectora opcional; y el subíndice t varía de 1 a 4.

31. El compuesto de Fármaco-Enlazador de la forma de realización 30 en el que X es -Y(W)-, en el que -Y(W)- está representado por la estructura de:



, en el que el enlace ondulado adyacente al átomo de nitrógeno de Y indica unión covalente a Z', A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y la marca (#) indica unión covalente del átomo de carbono bencílico de Y a la unidad de carbamato de metileno.

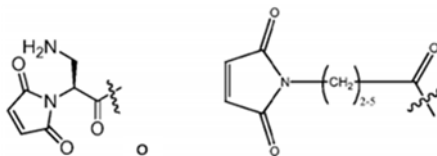
32. El compuesto de Fármaco-Enlazador de la forma de realización 30, en el que X es -W-Y-, en el que -W-Y- está representado por la estructura de:



, en el que el enlace ondulado adyacente al átomo de nitrógeno de W indica unión covalente de W a Z', A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B y la almohadilla (#) indica la unión covalente del átomo de carbono bencílico de Y a la unidad de carbamato de metileno.

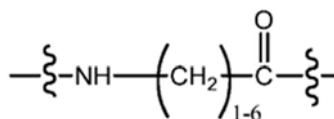
33. El compuesto de Fármaco-Enlazador de cualquiera de las formas de realización 30 a 32 en el que Z' comprende un resto maleimida.

34. El compuesto de Fármaco-Enlazador de la forma de realización 33, en el que Z' tiene la Fórmula:



en la que la línea ondulada adyacente al átomo de carbono del carbonilo indica la unión covalente de Z' a A, B o X, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B.

35. El compuesto de Fármaco-Enlazador cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en el que A está presente y tiene la Fórmula



36. El compuesto de Fármaco-Enlazador de cualquiera de las formas de realización 30 a 35, en el que B está ausente y el subíndice t es 1.

37. El compuesto Enlazador-Fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 35, en el que B está presente y el subíndice t es 2.

38. Una composición de Conjugado Ligando-Fármaco que comprende una pluralidad de compuestos conjugados, en la que cada uno tiene la estructura de un Compuesto Conjugado Ligando-Fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que los Compuestos Conjugados se diferencian por sus valores enteros de p; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

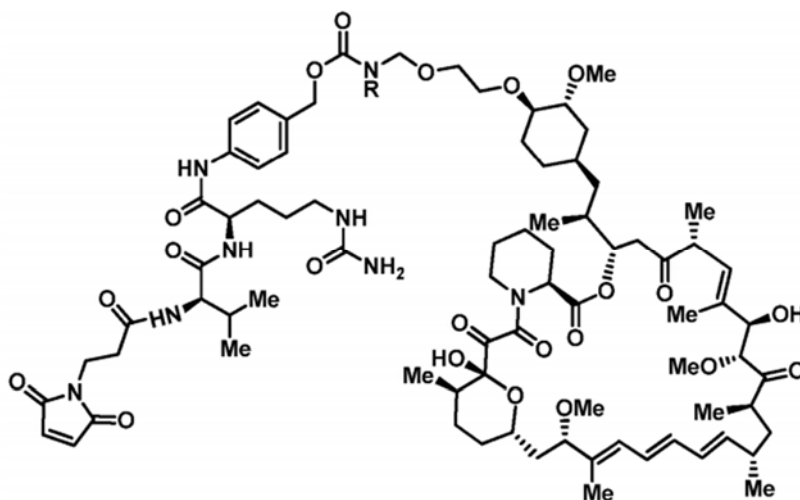
39. La composición de Conjugado de Fármaco-Ligando de la forma de realización 38 en la que hay un promedio de 2 a 10 restos enlazadores de fármaco por Unidad de Ligando.

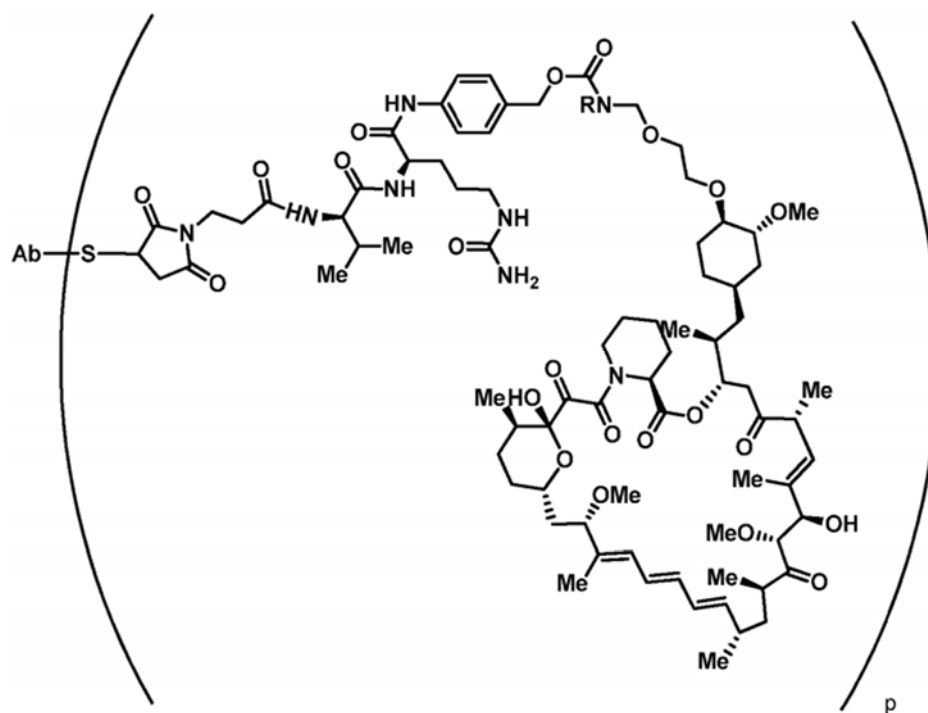
40. La composición de Conjugado de Fármaco-Ligando de la forma de realización 38 en la que hay un promedio de 2 a 8 restos enlazadores de fármaco por Unidad de Ligando.

41. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 1-29, el compuesto ligando-enlazador de cualquiera de las reivindicaciones 30-37 o la composición de conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 38-40, donde la unidad de fármaco corresponde en estructura a un compuesto que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo heteroátomo de oxígeno es capaz de incorporarse en una unidad de carbamato de metileno, donde el compuesto se une a FKBP para inhibir la función efectora de mTOR o calcineurina.

42. El compuesto conjugado de fármaco-ligando, compuesto enlazador de fármaco o composición de conjugado de fármaco-ligando de la forma de realización 41, en el que el compuesto de unión a FKBP es everolimus, tacrólimus o sirolimus.

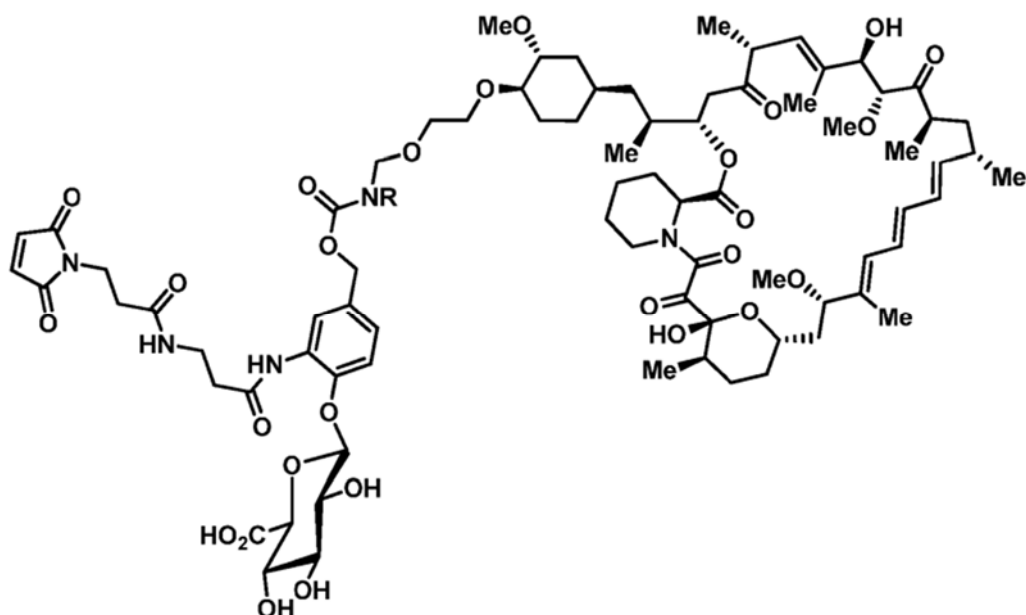
43. El compuesto conjugado de ligando-fármaco, compuesto de fármaco-enlazador o composición de conjugado de ligando-fármaco de la forma de realización 41, en el que el compuesto o composición tiene la estructura de:

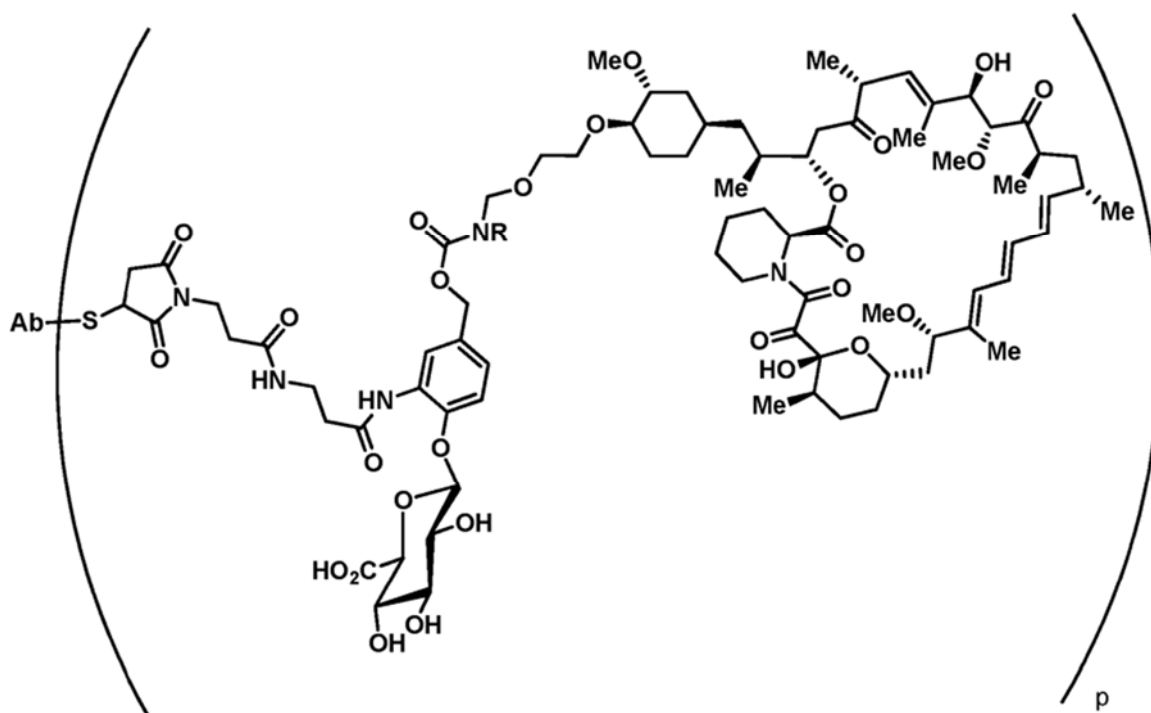




donde el resto Ab-S- es una Unidad de Ligando de un anticuerpo dirigido; R es hidrógeno y el subíndice p varía de 1 a 16 o de 1 a 8.

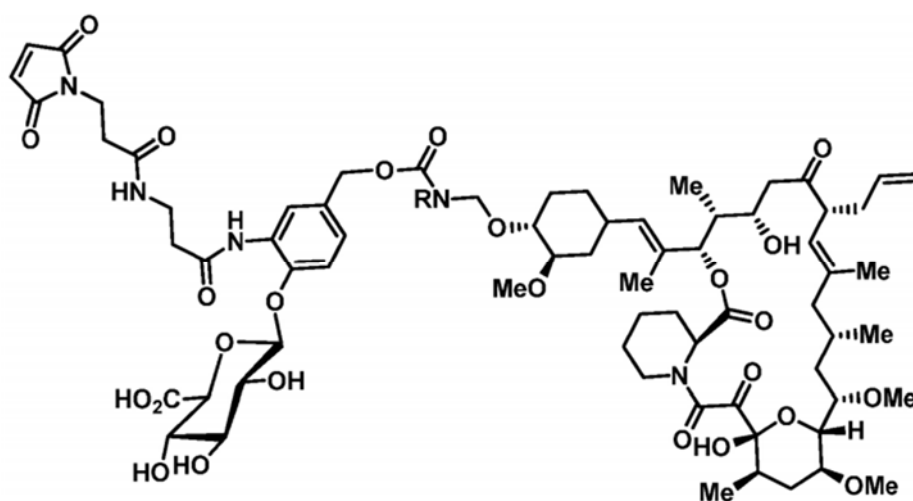
44. El compuesto conjugado ligando-fármaco, el compuesto ligando-enlazador o la composición conjugada ligando-fármaco de la forma de realización 41, donde el compuesto o composición tiene la estructura de:

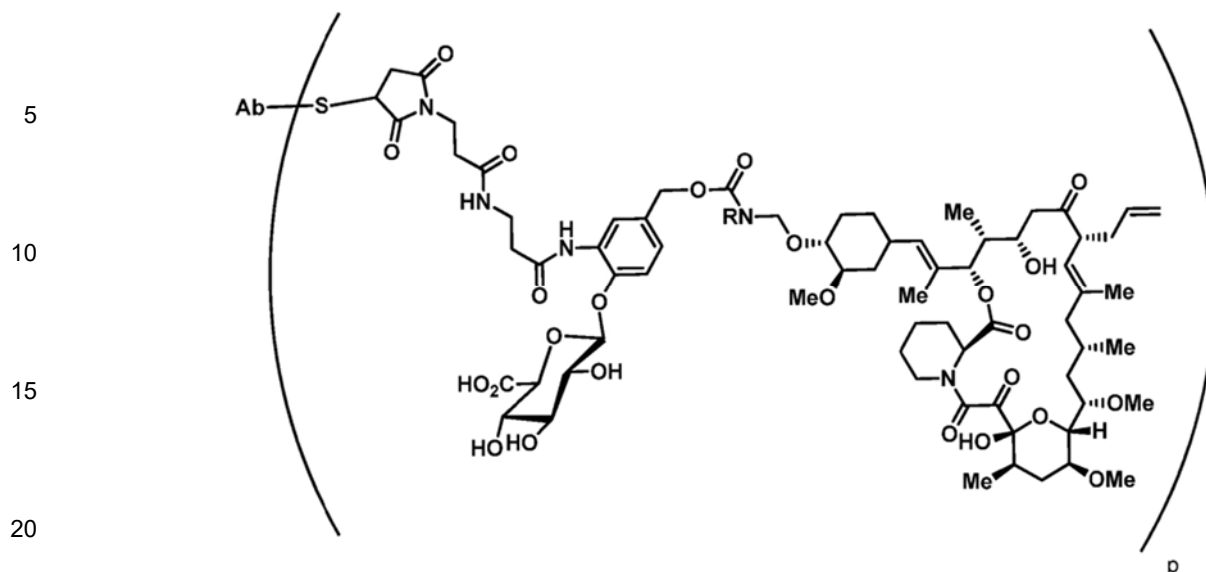




en el que el resto Ab-S- es una Unidad de Ligando de un anticuerpo dirigido; R es hidrógeno y el subíndice p varía de 1 a 16 o de 1 a 8.

45. El compuesto conjugado ligando-fármaco, el compuesto ligando-enlazador o la composición conjugada ligando-fármaco de la forma de realización 41, donde el compuesto o composición tiene la estructura de:



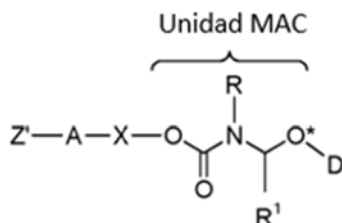


en el que el resto Ab-S- es una Unidad de Ligando de un anticuerpo dirigido; R es hidrógeno y el subíndice p varía de 1 a 16 o de 1 a 8.

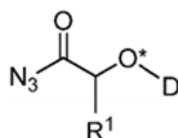
46. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las formas de realización 1-29, el compuesto ligando-enlazador de cualquiera de las formas de realización 30 a 37 o el compuesto ligando-fármaco Composición de conjugado de fármaco de cualquiera de las formas de realización 38 a 40, en la que la unidad de fármaco corresponde en estructura a una auristatina que tiene un grupo funcional hidroxilo cuyo heteroátomo de oxígeno es capaz de incorporarse en una unidad de carbamato de metileno, en la que el compuesto se une a la tubulina para interrumpir la función de la tubulina.

47. El compuesto conjugado de fármaco-ligando, el compuesto enlazador de fármaco o la composición de conjugado de fármaco-ligando de la forma de realización 46 en la que la auristatina es MMAE o auristatina T.

48. Un método para preparar un compuesto enlazador de fármaco que tiene la estructura de

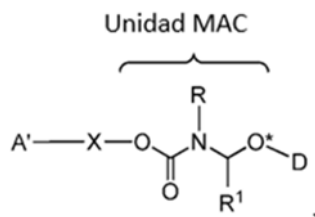


dicho método que comprende: poner en contacto un fármaco libre modificado que tiene la estructura de:



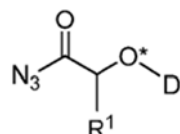
con un intermedio auto-inmolador representado por: Z'-A-X'-OH en condiciones suficientes para proporcionar la unidad MAC indicada a través del reordenamiento de Curtius, donde D es una unidad de fármaco que tiene una grupo hidroxilo funcional que se ha incorporado al MAC, cuyo heteroátomo de oxígeno se designa por O*; Z' es una Unidad Estiradora precursora de una Unidad Estiradora (Z) en un conjugado de ligando-fármaco y está compuesta por un grupo funcional capaz de conjugarse con un ligando dirigido; A es una Unidad Conectora opcional; X es un resto auto-inmolador activable; X' es un resto auto-inmolador precursor de X y tiene un grupo funcional hidroxilo que participa en el reordenamiento de Curtius; R es hidrógeno; y R' es hidrógeno.

49. Un método para preparar un intermedio de un compuesto de Fármaco-Enlazador en el que el intermedio tiene la estructura de:



5

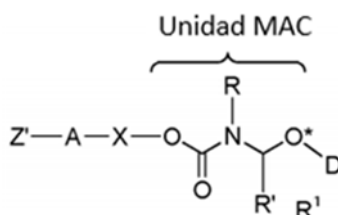
10 dicho método comprende: poner en contacto un fármaco libre modificado que tiene la estructura de:



15

20 con un intermedio auto-inmolador representado por: A'-X-OH, en condiciones suficientes para proporcionar la Unidad MAC indicada a través del reordenamiento de Curtius, donde D es una Unidad de Fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo que se ha incorporado en la MAC, el heteroátomo de oxígeno del que se designa O*, A' es un precursor de la Unidad Conectora de una Unidad Conectora (A) y está compuesto por un grupo funcional para la formación de enlaces con el resto de la Unidad Enlazadora del compuesto Enlazador-Fármaco; X es un resto auto-inmolador activable; R es hidrógeno; y R¹ es hidrógeno.

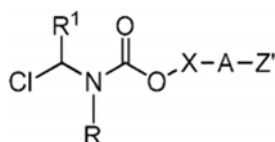
25 50. Un método para preparar un compuesto de Fármaco-Enlazador en el que el compuesto tiene la estructura de:



30

35

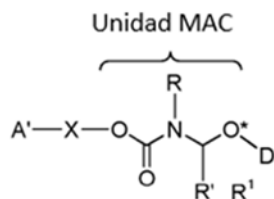
dicho método comprende: poner en contacto un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo libre con una N-clorometilamina que tiene la estructura de:



40

45 en condiciones suficientes para la sustitución del cloro átomo con el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional de fármaco libre, en el que Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) del Compuesto Enlazador de Fármaco y comprende un grupo funcional para la unión de un ligando dirigido; A es una Unidad Conectora opcional; X es un resto auto-inmolador activable; R es hidrógeno; y R¹ es hidrógeno.

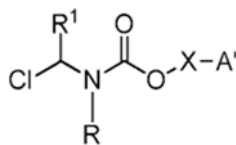
50 51. Un método para preparar un intermedio de un compuesto de Fármaco-Enlazador en el que el intermedio tiene la estructura de:



55

60 comprendiendo dicho método: poner en contacto un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo libre con una N-clorometilamina que tiene la estructura de:

65

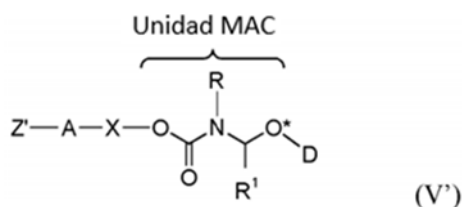


en condiciones suficientes para la sustitución del átomo de cloro con el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional de fármaco libre, en el que Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) del Compuesto Enlazador de Fármaco y comprende un grupo funcional para la unión de un ligando dirigido; A' es una Unidad Conectora precursora de una Unidad Conectora (A) y está compuesta por un grupo funcional para la formación de enlaces con el resto de la Unidad Conectora del compuesto de fármaco-enlazador; X es un resto auto-inmolador activable; R es hidrógeno; y R¹ es hidrógeno.

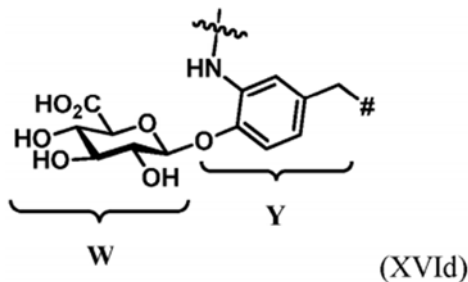
EJEMPLOS

Resumen:

Los ejemplos 1 y 2 describen preparaciones alternativas de un compuesto enlazador de fármaco que tiene una unidad de fármaco (D) unida covalentemente a una unidad de carbamato de alcoxi de metileno de Fórmula Ia' en la que la unidad de fármaco es de auristatina E. El Compuesto de fármaco-enlazador resultante tiene la estructura generalizada de Fórmula V':



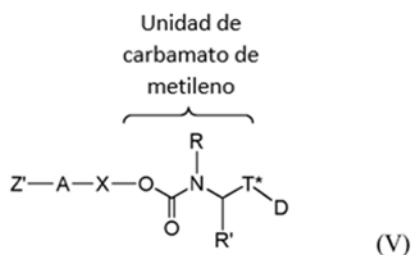
donde R y R¹ son hidrógeno y el resto activable X es -Y(W)- donde -Y(W)- tiene la estructura de Fórmula XVIId:



donde la línea ondulada al átomo de nitrógeno de la Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora (Y) indica unión covalente a la Unidad Conectora (A) y la marca de almohadilla (#) indica unión covalente del átomo de carbono bencílico de Y a la Unidad MAC, donde O* es el átomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del fármaco libre. El ejemplo 3 describe la síntesis de un modelo de Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad MAC cíclica y su autoinmolación condicional. El ejemplo 3 no cae dentro del alcance de la presente invención.

Los ejemplos 4, 5 y 6 describen la síntesis de compuestos enlazadores de fármaco en los que las unidades de fármaco son de triptólido, everolimus y tacrólimus (FK-506), respectivamente, en los que se usa un grupo funcional hidroxilo del fármaco libre en la conjugación para que su heteroátomo de oxígeno se incorpore a una Unidad MAC de Fórmula Ia'. Para dos de esos fármacos (tacrólimus y triptólido), el grupo funcional hidroxilo es un grupo funcional hidroxilo secundario estéricamente impedido.

El ejemplo 7 describe la síntesis de un compuesto enlazador de fármaco que tiene una unidad de fármaco (D) unida covalentemente a una unidad de carbamato de metileno de Fórmula Ia en la que la unidad de fármaco es un compuesto que contiene tetrahidroquinolina (BMN-673). El compuesto enlazador de fármaco resultante tiene la estructura generalizada de Fórmula V:



en la que R y R' son hidrógeno y el resto activable X es -Y(W)- que tiene la estructura de Fórmula XVI d y en la que T* representa el heteroátomo de nitrógeno ciclado del grupo funcional amina (-NH-) en el sistema de anillo de tetrahydroquinolina de BMN-673 que se ha incorporado en una unidad de carbamato de metileno. El ejemplo demuestra una variante de la Unidad MAC adaptada para su uso en la conjugación de fármacos que contienen aminas, en este caso donde T* es un nitrógeno de anilina cíclica. El ejemplo 7 no cae dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo 8 describe la preparación de Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras modelo, cada una compuesta por unidades MAC y su variante unida covalentemente a una unidad de fármaco correspondiente a compuestos de fármaco modelo para fármacos que contienen tiol, fármacos que contienen alcohol alifático primario, secundario y terciario y fármacos que contienen alcohol fenólico en los que cada Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora es capaz de liberar el compuesto de fármaco modelo posterior al inicio de la autoinmolación dentro de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora. Los compuestos del ejemplo 8 no entran dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo 9 describe la estabilidad *in vitro* a la hidrólisis espontánea de unidades MAC y sus variantes en Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras de fracciones enlazadoras de fármaco en conjugados de fármaco y ligando modelo y el aumento inesperado en la vida media a pH 7,0 que resulta de una unidad básica unida al nitrógeno carbamato de la unidad MAC. Los compuestos del ejemplo 9 no entran dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo 10 describe estabilidades *in vitro* de conjugados de N-acetilcisteína (NAC) en los que el resto de N-acetilcisteinilo es un sustituto de una Unidad de Ligando frente a la hidrólisis espontánea de su unidad de carbamato de metileno.

El ejemplo 11 describe la estabilidad *ex vivo* de un ADC frente a la hidrólisis espontánea de su unidad de carbamato de metileno.

El ejemplo 12 describe la liberación de fármaco o compuestos modelo para un fármaco que contiene tiol, fármacos que contienen alcohol alifático primario, secundario y terciario, y un fármaco que contiene alcohol aromático a partir de conjugados de NAC que tienen una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora compuesta por una Unidad MAC o variante de la misma posterior a la activación de esa unidad por glucuronidasa. El ejemplo 12 no cae dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo 13 describe la liberación eficiente de un compuesto que contiene tetrahydroquinolina (BMN-673) cuyo nitrógeno de amina aromática corresponde al heteroátomo de nitrógeno opcionalmente sustituido de una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una unidad de fármaco a partir de un conjugado de NAC compuesto por una Unidad de Ensamblaje auto-inmoladora tras la activación condicional que inicia la autoinmolación dentro de las Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras compuestas por estas unidades de carbamato de metileno. El ejemplo 13 no se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

El ejemplo 14 describe la citotoxicidad de los conjugados de fármaco y anticuerpo para las células cancerosas dirigidas por su Unidad de Ligando de anticuerpo, cada una de las cuales tiene una unidad MAC que libera condicionalmente un fármaco libre de citotóxicos. El ejemplo 14 no cae dentro del alcance de la presente invención.

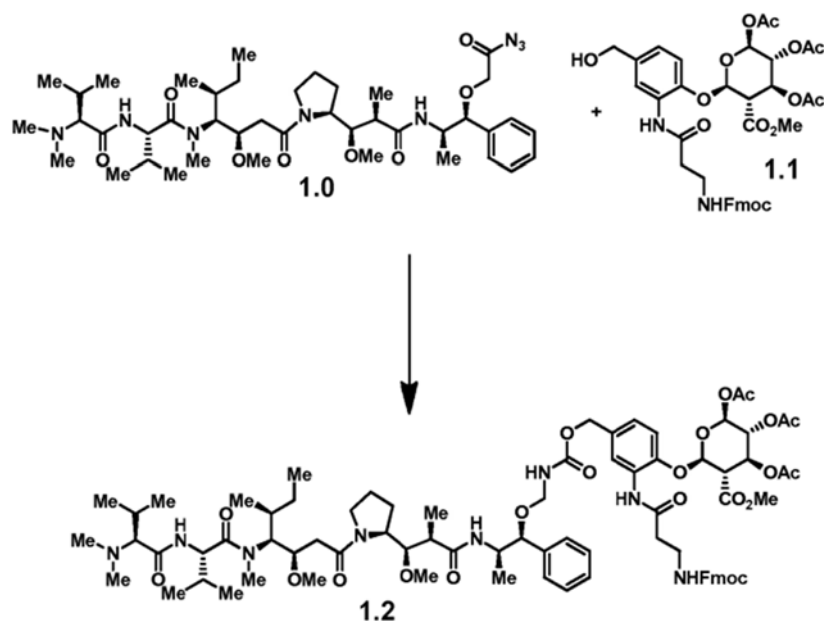
Información general:

La siguiente información es aplicable a los procedimientos sintéticos descritos en esta sección a menos que se indique lo contrario. Todos los disolventes anhidros disponibles comercialmente se usaron sin purificación adicional. La cromatografía analítica en capa fina se realizó en láminas de aluminio de gel de sílice 60 F254 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). La cromatografía radial se realizó en un aparato Chromatotron™ (Harris Research, Palo Alto, CA). La cromatografía en columna se realizó en un sistema de purificación flash Biotage Isolera One™ (Charlotte, NC). Se realizó HPLC analítica en un sistema de suministro de disolvente Varian ProStar™ 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Las muestras se eluyeron en una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi™ 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80 Å. La fase móvil ácida consistía en acetonitrilo y agua que contenían ambos ácido trifluoroacético al 0,05 % o ácido fórmico al 0,1 %. Los compuestos se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo ácido desde el 5 % 1 min después de la inyección hasta el 95 % a los 11 min, seguido de acetonitrilo isocrático al 95 % hasta los 15 min (tasa de flujo = 1,0 ml/min). La CL-EM se realizó en un espectrómetro de masas Waters Xevo™ G2 Tof conectado a un módulo de separaciones Waters 2695 equipado con una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi 2,0 x 150 mm, 4 µm, 80

A con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996. El eluyente ácido consistió en un gradiente lineal de acetonitrilo del 5 % al 95 % en ácido fórmico acuoso al 0,1 % durante 10 min, seguido de acetonitrilo isocrático al 95 % durante 5 min (velocidad de flujo = 0,4 ml/min). La UPLC-MS se realizó en un detector de masas Waters SQ interconectado con un LC Acquity Ultra Performance™ equipado con una columna de fase inversa Acquity UPLC BEH C18 2,1 x 50 mm y 1,7 µm. La fase móvil ácida (ácido fórmico al 0,1 %) constaba de un gradiente de acetonitrilo al 3 %/agua al 97 % hasta acetonitrilo al 100 % (tasa de flujo = 0,5 ml/min a menos que se indique lo contrario). La HPLC preparativa se llevó a cabo en un sistema de suministro de disolvente Varian ProStar 210 configurado con un detector Varian ProStar 330 PDA. Los productos se purificaron en una columna de fase inversa C12 Phenomenex Synergi 10,0 x 250 mm, 4 µm, 80 Å, eluyendo con ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua (disolvente A) y ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo (disolvente B). El método de purificación consistió en el siguiente gradiente de solvente A a solvente B: 90:10 de 0 a 5 min; 90:10 a 10:90 de 5 min a 80 min; seguido de isocrático 10:90 durante 5 min. El caudal fue de 4,6 ml/min con monitorización a 254 nm.

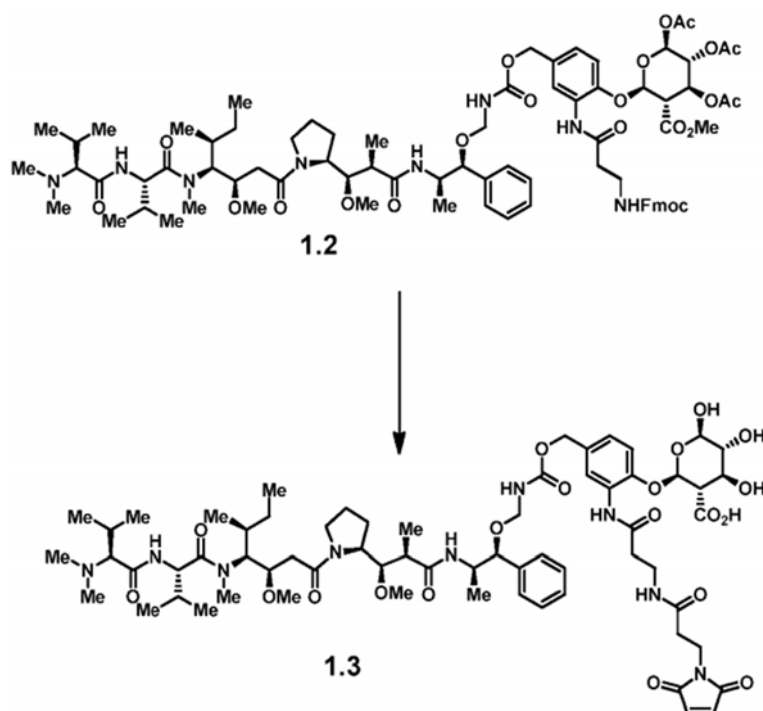
Ejemplo 1: Síntesis de un compuesto enlazador de fármaco auristatina E que comprende el enlazador MAC utilizando la transposición de Curtius

Síntesis de transposición de Curtius de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-6-(2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-((7S,8R,11R,12R)-12-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)fenoxi)-5-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4-triilo (1.2) a través de la transposición de Curtius



A la azidocetona 1,0 (30 mg, 37 µmol), sintetizada a partir del correspondiente alcohol de auristatina libre (para la síntesis de 1,1 véase Jeffrey et al., Org. Lett. (2010) 12:277) en DMF (250 µmol) a temperatura ambiente se añadió 1,1 (90 mg, 120 µmol) a la solución seguido de 5 µl de dilaurato de dibutilestaño. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 1 hora, momento en el que la CL/EM mostró que la reacción se había completado. Posteriormente, la reacción se purificó directamente mediante HPLC preparativa (gradiente 5-95 de actonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) para producir 22 mg de 1,2. MS (m/z) [M + H]⁺ calc para C₈₀H₁₁₀N₈O₂₂ 1535,77, encontrado 1535,80.

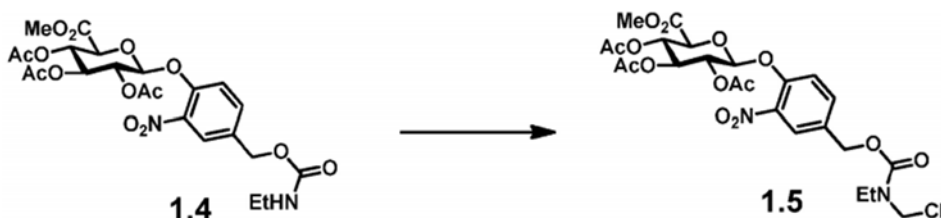
Síntesis de Ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(4-((7S,8R,11R,12R)-12-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)-2-(3-(3)-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-4,5,6-trihidroxitetrahidro-2H-piran-3-carboxílico (1.3):



A una solución 1:1 de MeOH:agua de 1.2 (15 mg, 10 μ mol) se añadió LiOH (5 mg). La mezcla de reacción resultante se agitó vigorosamente durante 10 min a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM mostró que la reacción se había completado. A continuación, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) para producir 8 mg de 1.2 desprotegido. Posteriormente, se añadió DMF (100 μ l) a un vial que contenía 8 mg de 1.2 desprotegido seguido de 20 μ l de base de Hünig y 10 mg (40 mmol) de éster de N-hidroxisuccimida del ácido 3-maleimidopropiónico. A continuación, la reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. Posteriormente, la reacción se purificó directamente por HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) para producir 7 mg de 1.3, 60 de rendimiento. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para C₆₅H₉₇N₉O₂₀, 1324,68, encontrado 1324,60.

Ejemplo 2: Síntesis de un compuesto enlazador de fármaco de auristatina E que comprende el enlazador MAC a través de la síntesis de N-clorometilamina (el ejemplo 2 no cae dentro del alcance de la presente invención cuando R es distinto de hidrógeno)

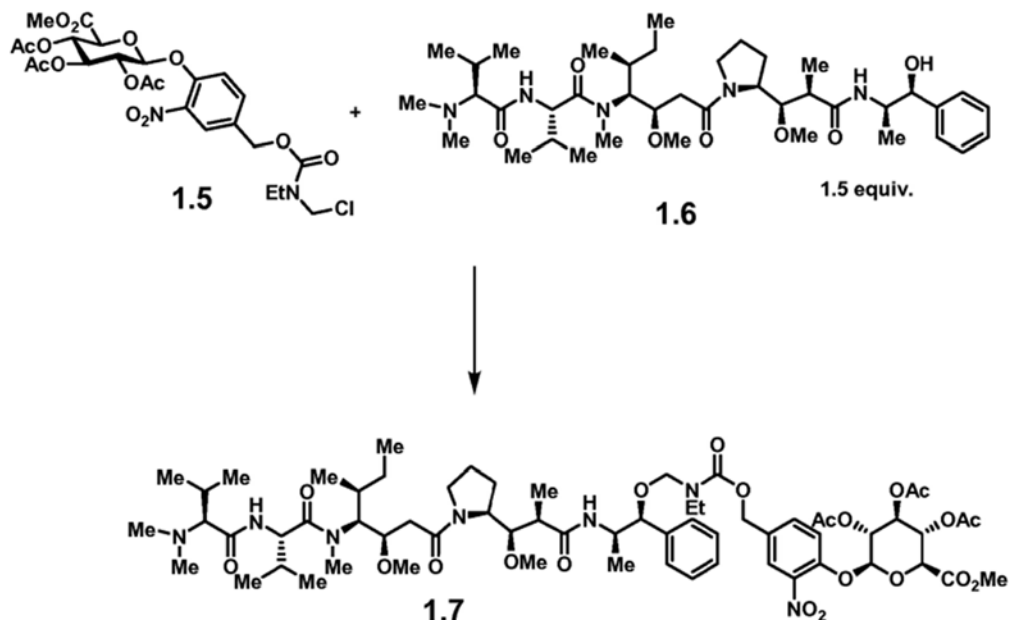
Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((clorometil)(etil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1.5):



A una solución de 1.4 (400 mg, 0.36 mmol) (para la preparación de 1.4 ver Bosslet et al., 1998, J. Med. Chem 41:3572) en DCM (4 mL) se añadió paraformaldehído (32 mg, 0.54 mmol) y TMSCl (0,212 mL, 1,1 mmol). La reacción se agitó durante 2 horas adicionales a TA con seguimiento utilizando metanol como diluyente y siguiendo la formación del aducto de metanol por CL/EM. Posteriormente, la reacción se filtró y secó *al vacío* 450 mg de 1.5 crudo, que luego se usó en la reacción posterior sin más purificación (ver procedimiento de Barnes et al., 2009, Org. Lett. 11:273). MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para el aducto de metanol C₂₅H₃₂N₂O₁₅ 601,18, encontrado 601,21.

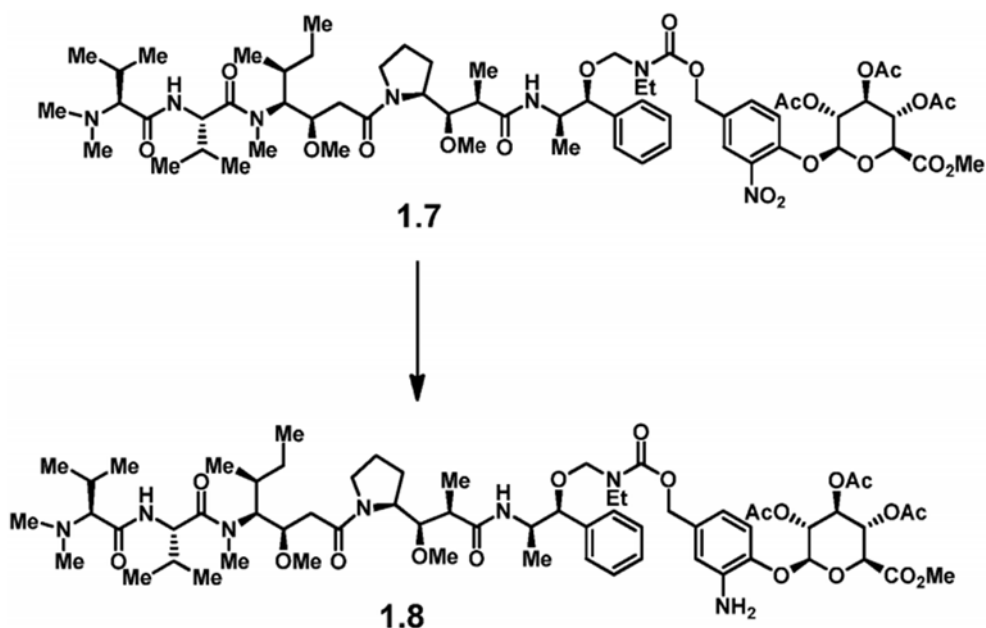
Síntesis de triacetato de (2R,3S,4R,5R,6R)-2-(4-((7S,8R,11R,12R)-12-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-4-etil-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-

2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-pirano-3,4,5-triilo (1,7) mediante sustitución de N-clorometilamina:



A una solución de 1,5 (60 mg, 100 μ mol) en DCM (300 μ l) se añadió 1,6 (110 mg, 150 μ mol) y base de Hünig (50 μ l). La reacción se agitó durante 90 minutos más a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM mostró que la reacción se había completado. A continuación, la reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) para producir 45 mg de 1,7. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₆₄H₉₇N₇O₂₁ 1300,67, encontrado 1300,71.

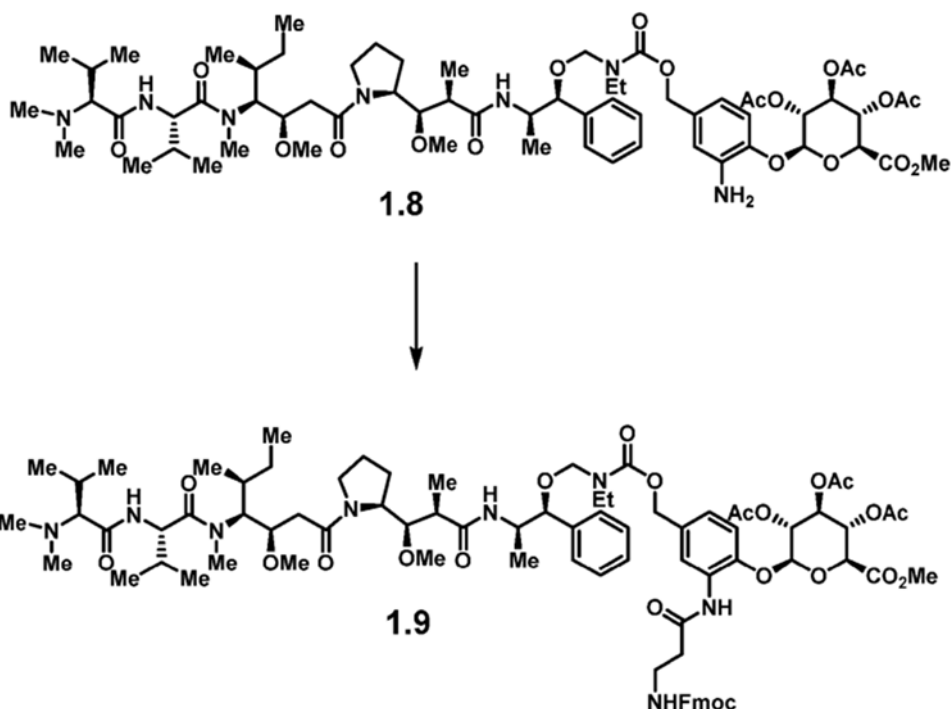
Síntesis de triacetato de (2R,3S,4R,5R,6R)-2-(2-amino-4-((7S,8R,11R,12R)-12-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-4-etil-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-pirano-3,4,5-triilo (1,8):



A 1,7 (10 mg, 6 μ mol) de MeOH (200 μ l) a temperatura ambiente se añadió samario metálico (10 mg, 66 μ mol) y cloruro

de amonio (10 mg, 100 μ mol). La mezcla de reacción se sonicó durante 10 minutos, momento en el que la CL/EM mostró que la reacción se había completado. A continuación, se añadió base de Hünig (50 μ l) a la reacción, que posteriormente se filtró a través de un embudo fritado. A continuación, la mezcla de reacción se recogió en agua y se purificó mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) para producir 22 mg de 1,8. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para C₆₄H₉₉N₇O₁₉ 1448,75, encontrado 1448,71.

La síntesis de triacetato de (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-2-(2-amino-4-((7*S*,8*R*,11*R*,12*R*)-12-((*S*)-1-((3*R*,4*S*, 5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-4-etil-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (1,9)



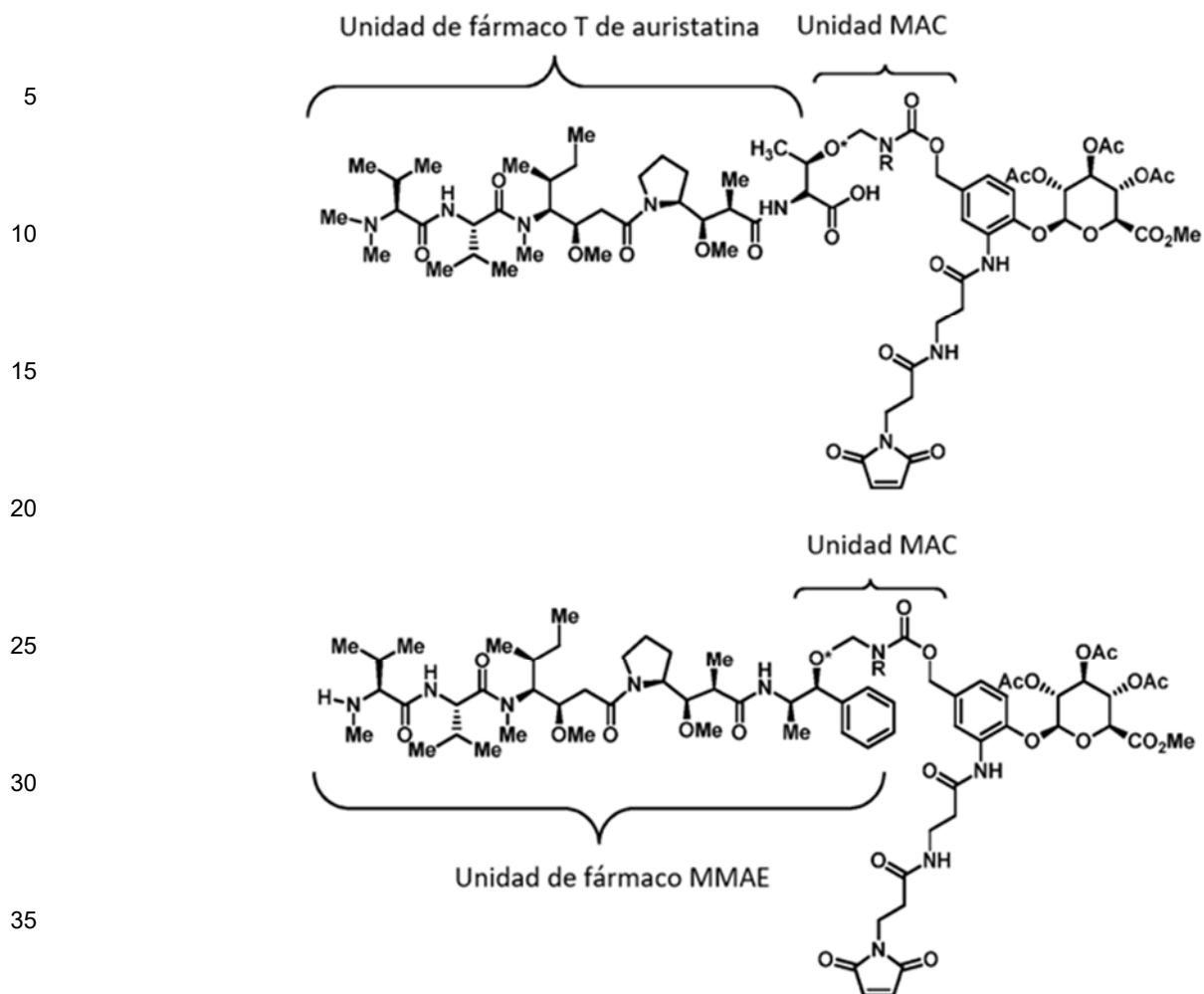
A un vial de 1 dram equipado con una barra de agitación se le añadieron 100 μ l de DCM seguido de 5 mg (4,0 μ mol) 1,8, Fmoc β -alanina (3 mg, 14 μ mol) y 5 mg (21 μ mol) de *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 3 h a TA, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) para producir 5 mg de 1,9, 83 %. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₈₂H₁₁₄N₈O₂₂ 1563,80, encontrado 1563,84.

La síntesis de ácido (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-6-(4-((7*S*,8*R*,11*R*,12*R*)-12-((*S*)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(dimetilamino)-3-metilbutanamido)-*N*,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-4-etil-8,11-dimetil-3,10-dioxo-7-fenil-2,6,13-trioxa-4,9-diazatetradecil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico, (2,0)



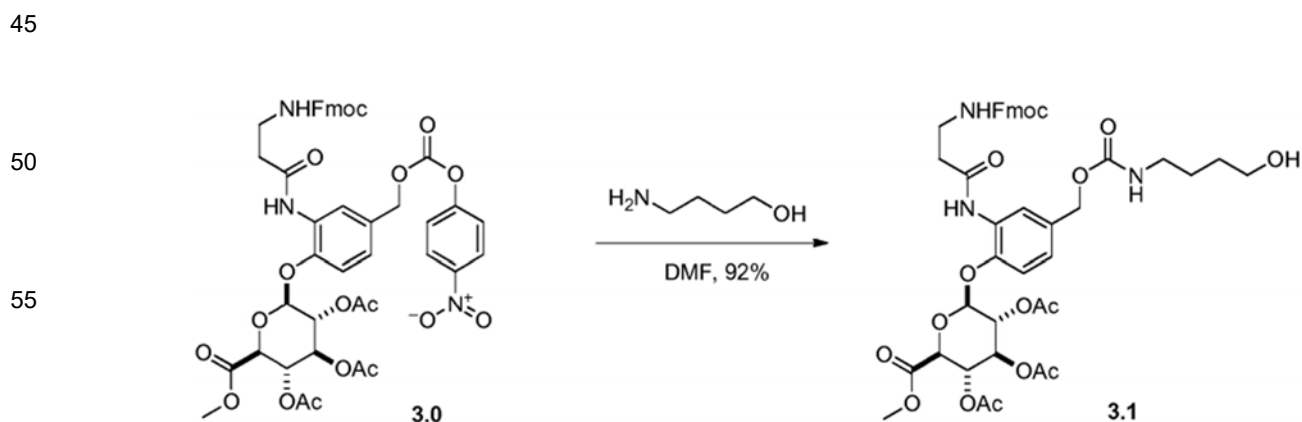
35
40

45



donde R es hidrógeno o etilo y O* es el heteroátomo de oxígeno de la unidad MAC del grupo funcional hidroxilo secundario de auristatina T o MMAE.

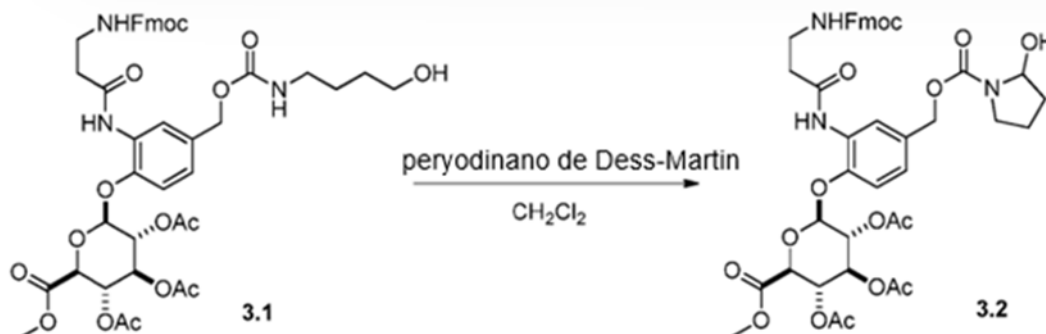
Ejemplo 3: Síntesis de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora modelo que tiene una unidad MAC cíclica y su autoinmolación condicional



Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-hidroxibutil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (3,1):

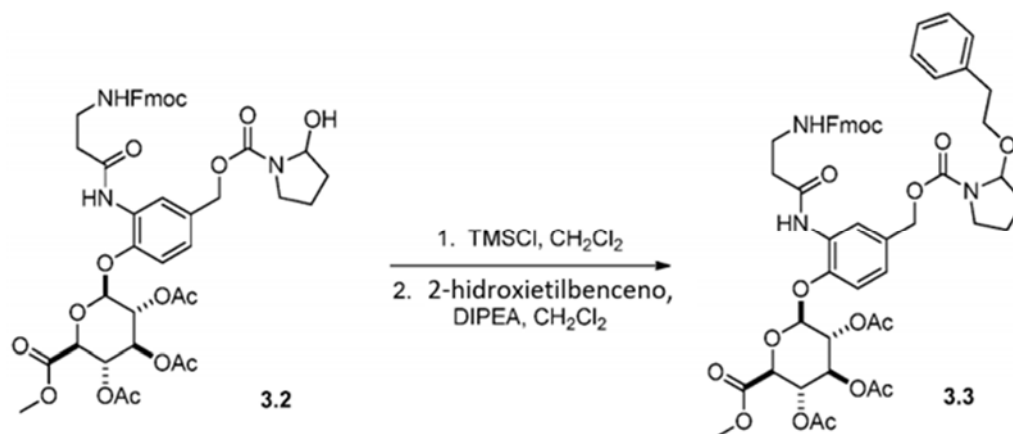
A una mezcla de carbonato de para-nitrofenilo 3,0 (300 mg, 0,33 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió 4-aminobutan-1-ol (58 mg, 0,66 mmol). Tras la adición del 4-aminobutan-1-ol, la reacción se completó según lo juzgado por UPLC-MS. La mezcla

se vertió en acetato de etilo (100 mL) que se lavó con agua (3x50 mL) y salmuera (1x50 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se decantó y se concentró hasta un residuo que se purificó por cromatografía radial en una placa de cromatotrón radial de 2 mm eluyendo con acetato de etilo. Las fracciones que contenían el producto se concentraron a presión reducida para dar 260 mg (92 %) de 3,1: ^1H RMN (CDCl_3) δ 8,40 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,75 (d, 2H, $J=7,9$ Hz), 7,60 (d, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,38 (t, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,29 (m, 2H), 7,01 (d, 1H, $J=2,0$ Hz), 6,91 (d, 1H, $J=6,2$ Hz), 5,73 (bs, 1H), 5,4 (t, 1H, $J=9,4$ Hz), 5,29 (m, 2H), 5,05-5,03 (m, 3H), 4,95 (m, 1H), 4,38 (pent, 2H, $J=7,5$ Hz), 4,23 (t, 1H, $J=7,1$ Hz), 4,16 (d, 1H, $J=9,7$ Hz), 3,73 (s, 3H), 3,65-3,50 (m, 7H), 3,21 (m, 2H), 2,73 (m, 2H), 2,06-2,04 (m, 9H), 1,65-1,59 (m, 4H); UPLC-MS (m/z) (AP+) 864,44 (M+H), $t_r = 1,44$ min (caudal 0,7 ml/min).



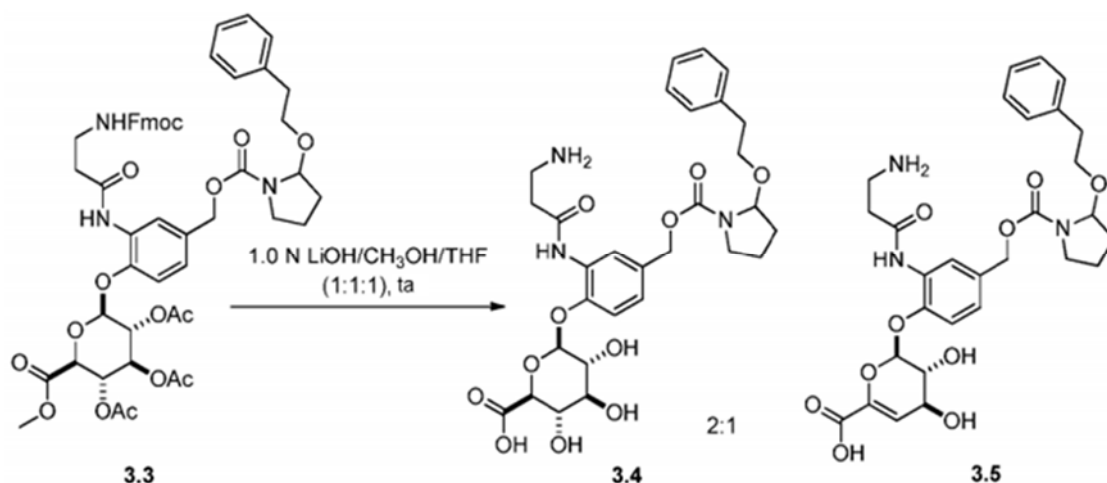
Triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((2-hidroxipirrolidina-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (3.2):

A una mezcla del alcohol 3,1 (50 mg, 0,056 mmol) en diclorometano (2 ml) se añadió peryodinano de Dess-Martin (30 mg, 0,067 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h antes de purificarse directamente en una placa de cromatotrón radial de 1 mm, eluyendo con acetato de etilo al 50 % en hexanos, seguido de acetato de etilo al 100 % para proporcionar 19,4 mg (39 %) de 3,2: ^1H RMN (CD_3OD) δ 8,04 (d, 2H, $J=6,3$ Hz), 7,78 (d, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,63 (d, 2H, $J=7,5$ Hz), 7,37 (t, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,25 (q, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,22 (m, 2H), 7,11 (t, 2H, $J=8,2$ Hz), 5,49 (t, 1H, $J=10,2$ Hz), 5,46 (bs, 1H), 5,40 (d, 1H, $J=7,9$ Hz), 5,19 (t, 1H, $J=9,8$ Hz), 5,06-5,00 (m, 2H), 4,76 (d, 1H, $J=10,1$ Hz), 4,37-4,30 (m, 2H), 4,25 (t, 1H, $J=6,2$ Hz), 3,69 (s, 3H), 3,55-3,45 (m, 4H), 2,65 (pent, 2H, $J=6,7$ Hz), 2,07-1,95 (m, 11H), 1,24 (m, 3H); UPLC-MS (m/z) (AP+) 884,41 (M+Na⁺), $t_r = 1,48$ min (caudal 0,7 ml/min).



Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((2-fenetoxipirrolidin-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (3.3):

A una mezcla de pirrolidinol 3,2 (19,4 mg, 22,4 μmol) en diclorometano (2 ml) se le añadió TMSCl (20 μl) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h. La mezcla se concentró a presión reducida, incluido alto vacío durante 10 min. El residuo resultante se disolvió en diclorometano (1 ml) seguido de 2-hidroxietilbenceno (10 μl) junto con DIPEA (10 μl). Inmediatamente después de la adición del alcohol y DIPEA, la reacción se completó según lo juzgado por UPLC-MS. La mezcla se aspiró directamente en una placa de cromatotrón radial de 1 mm y se eluyó con acetato de etilo al 50 % en hexanos para dar 13,8 mg (63 %) de 3,3: ^1H RMN (CD_3OD) δ 8,13 (bs, 1H), 8,08 (bs, 1H), 7,76 (d, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,61 (d, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,35 (t, 2H, $J=7,4$ Hz), 7,27-7,03 (m, 8H), 5,48 (t, 1H, $J=9$ Hz), 5,37 (d, 1H, $J=7,9$ Hz), 5,3-5,17 (m, 3H), 5,05-4,99 (m, 2H), 4,44 (d, 1H, $J=9,8$ Hz), 4,34-4,30 (m, 2H), 4,22 (bs, 1H), 3,79-3,67 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,64-3,55 (m, 2H), 3,49 (bs, 1H), 3,30 (m, 1H), 2,79 (bs, 1H), 2,66 (m, 3H), 2,01 (s, 6H), 1,96 (s, 3H), 1,81 (m, 2H), 1,75-1,65 (m, 2H); UPLC-MS: MS analítico (m/z) (ESI+) 988,48 (M+Na⁺), $t_r = 1,65$ min (caudal 0,7 ml/min).

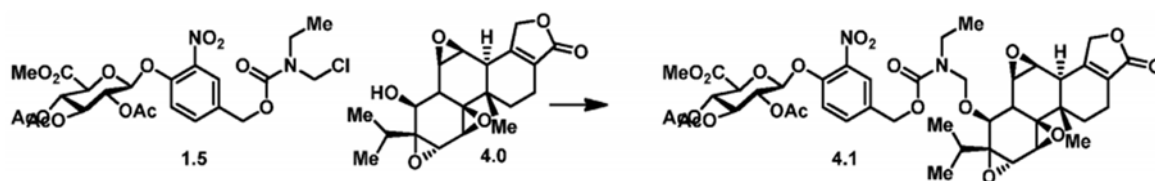


Síntesis de ácido (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(2-(3-aminopropanamido)-4-(((2-fenetoxipirrolidin-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2*H*-piran-2-carboxílico (3,4):

A una mezcla de pirrolidina 3.3 (50 mg) en metanol (2 mL) y THF (2 mL) se le añadió gota a gota una solución acuosa de hidróxido de litio 1,0 N (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La inspección de la mezcla de reacción por UPLC-MS reveló una desprotección completa a una mezcla ~2:1 del producto deseado 3,4 al producto de eliminación 3,5. La mezcla de reacción se neutralizó a pH 7 mediante la adición gota a gota de ácido acético. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo resultante se recogió en agua desionizada (2 mL) y se filtró. Esta solución se usó directamente para evaluar la estabilidad *in vitro* usando las condiciones descritas en el ejemplo 8: UPLC-MS analítica: MS (*m/z*) 604,35 (*M*+*H*⁺), *t_r* (3,4) = 0,88 min (caudal 0,7 mL/min).

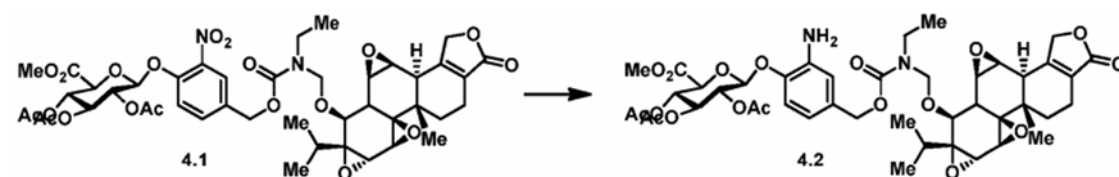
Ejemplo 4: Síntesis de un compuesto de Fármaco-Enlazador de triptólido que comprende una unidad MAC

Síntesis de (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(((etil(((5*bS*,5*cS*,6*aR*,7*S*,7*aR*,8*aS*,8*bS*,9*aS*,9*bS*)-7*a*-isopropil-9*b*-metil-3-oxo-1,3,5,5*b*,5*c*,6*a*,6*b*,7,7*a*,8*a*,8*b*,9*b*-dodecahidro-2*H*-tris(oxireno)[2',3':4*b*,5;2'',3'':6,7;2-,3-:9,10]fenantro[1,2-*c*]furan-7-*il*)oxi)triacetato de)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (4,1):



Siguiendo el procedimiento de cloramina del Ejemplo 2 para preparar el compuesto 1,7: utilizando 109 mg (0,17 mmol) de 250 mg (0,13 mmol) 1,5, (, de 7,0 y 65 µL (4,30 mmol) de base de Hünig proporcionaron 85 mg de 7,1, 72 % de rendimiento UPLC-MS analítico: *t_r* = 2,21 min MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc C₄₄H₅₂N₂O₂₀ 929,31, encontrado 929,29

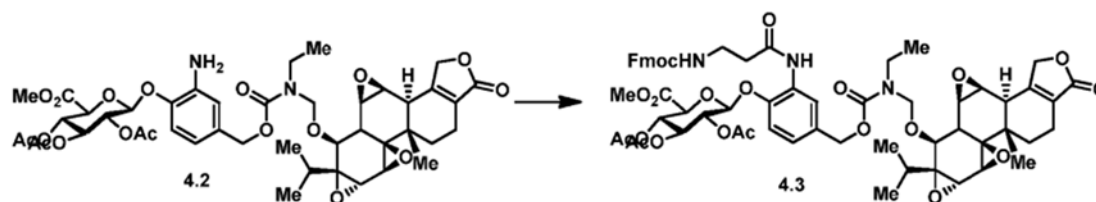
Síntesis de (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-2-(2-amino-4-(((etil(((5*bS*,5*cS*,6*aR*,7*S*,7*aR*,8*aS*,8*bS*,9*aS*,9*bS*)-7*a*-isopropil-9*b*-metil-3-oxo-1,3,5,5*b*,5*c*,6*a*,6*b*,7,7*a*,8*a*,8*b*,9*b*-dodecahidro-2*H*-tris(oxireno)[2',3':4*b*,5;2'',3'':6,7;2-,3-:9,10]fenantro[1,2-*c*]furan-7-*il*)oxi)triacetato de)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxycarbonil)tetrahydro-2*H*-piran-3,4,5-triilo (4.2):



Se equipó un matraz de fondo redondo de 25 mL con un globo de argón se cargó con 370 µL de MeOH, 85 mg (0,1 mmol) de 4,1 y 5 mg de Pd/C al 10 %. A continuación, la mezcla de reacción se aspiró, se purgó y se lavó con hidrógeno a través

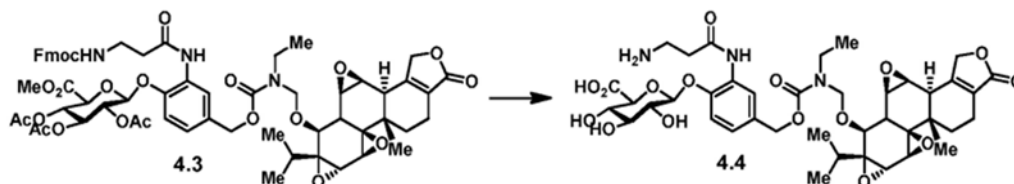
del globo 3 veces. Equipada con un globo de hidrógeno, la mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 1 hora a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que las reacciones se habían completado. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y purificó mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) para producir 35 mg de 4,2, rendimiento del 44 %. UPLC-MS analítica: $t_r = 2,14$ min. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{44}H_{54}N_2O$ 18 899,34, encontrado 899,37.

Síntesis de triacetato de (2S, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino) propanamido)-4-(((etil(((5bS,5cS,6aR,7S,7aR,8aS,8bS,9aS,9bS)-7a-isopropil-9b-metil-3-oxo-1,3,5,5b,5c,6a,6b,7,7a,8a,8b,9bdodecahido-2H-tris(oxireno)[2',3':4b,5;2'',3'':6,7;2''',3''':9,10]fenantro[1,2-c]furan-7-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (4.3):



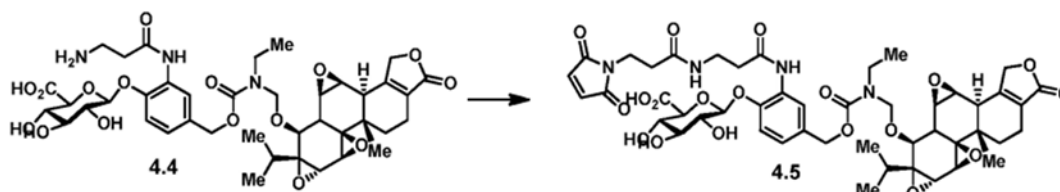
A un vial de 1 dram equipado con una barra agitadora se agregaron 200 μ l de DCM seguido de 6 mg (7,0 μ mol) 4.2, Fmoc β -alanina (8 mg, 28 μ mol) y 7 mg (0,28 μ mol) *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 3 h más a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) para producir 6 mg de 4,3, 75 %. UPLC-MS analítica: $t_r = 2,34$ min. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{62}H_{69}N_3O_{21}$ 1192,44, encontrado 1192,45.

Síntesis de (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)-4-(((etil(((5bS,5cS,6aR,7S,7aR,8aS,8bS,9aS,9bS)-7a-isopropil-9b-metil-3-oxo-1,3,5,5b,5c,6a,6b,7,7a,8a,8b,9bdodecahido-2H-tris(oxireno) ácido [2',3':4b,5;2'',3'':6,7;2''',3''':9,10]fenantro[1,2-c]furan-7-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (4,4):



Si siguiendo el método de desprotección del Ejemplo 2 para obtener el compuesto 2,0: el compuesto 4.3 (4,0 mg, 3 μ mol) se convirtió en 2,8 mg de 4,4, 95 % de rendimiento. UPLC-MS analítica: $t_r = 1,14$ min. EM (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{40}H_{51}N_3O$ 16 830,33, encontrado 830,32.

Síntesis de (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)-4-(((etil(((5bS,5cS,6aR,7S,7aR,8aS,8bS,9aS,9bS)-7a-isopropil-9b-metil-3-oxo-1,3,5,5b,5c,6a,6b,7,7a,8a,8b,9bdodecahido-2H tris(oxireno) ácido [2',3':4b,5;2'',3'':6,7;2''',3''':9,10]fenantro[1,2-c]furan-7-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (4,5):

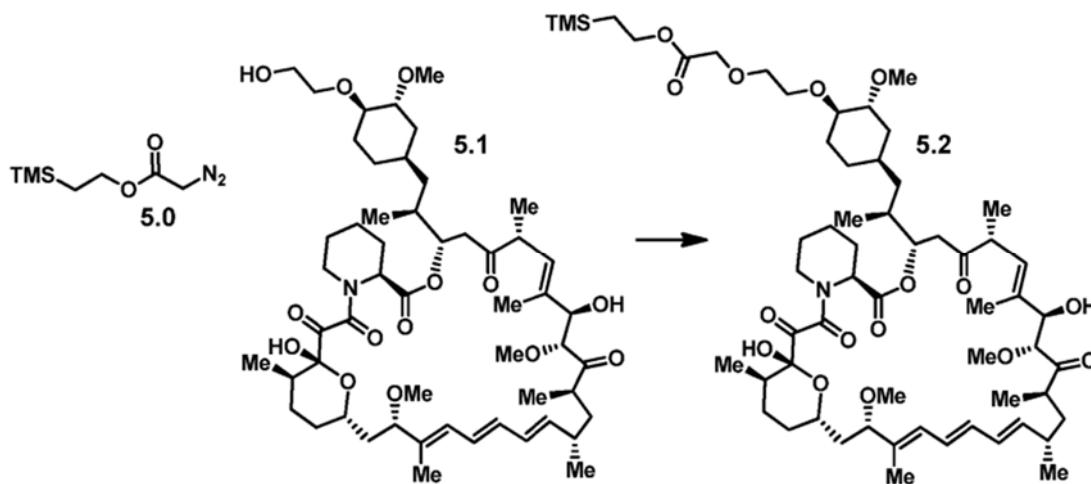


A un vial de 1 dram que contenía 2 mg de 4,4 (2 μ mol) se le añadieron 100 ml de DMF seguido de 20 μ l (0,1 mmol) de base de Hünig y 2,5 mg (9 μ mol) de ácido 3-maleimidopropiónico *N*-éster de hidroxisuccimida. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos más a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de

acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) apagando primero con TFA al 2 %:agua (3 ml) para producir 1,8 mg, rendimiento del 90 %, de 4,5. UPLC-MS analítica: $t_r = 1,61$ min. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc para $C_{47}H_{56}N_4O$ 19, 981,35, encontrado 981,38.

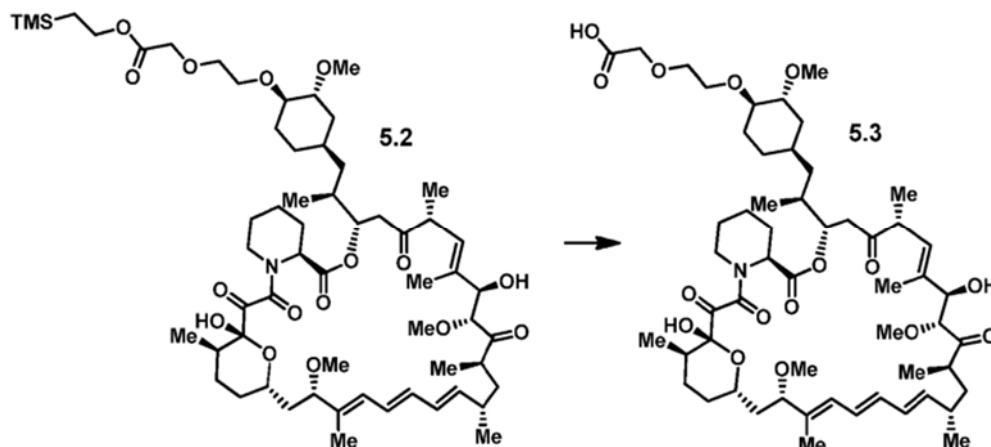
Ejemplo 5: Síntesis de un compuesto de Fármaco-Enlazador de everolimus que comprende una unidad MAC

Síntesis de 2-(trimetilsilil)etilo 2-(2-[[[(1R,2R,4R)-4-[(2S)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1,0⁴,⁹]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil]oxi]etoxi)acetato (5,1):



Se cargó un vial de 1 dram equipado con un tapón de rosca con septa y una barra de agitación con 1 ml de DCM seco, 2 mg (1 μ mol) de rodio diacetato y 100 mg (0,1 mmol) de everolimus (5,1). Se añadieron gota a gota a la mezcla de reacción con agitación a temperatura ambiente 40 μ l (0,2 mmol) de diazoacetato de trimetiletilo (5,0). CL/EM indicó que la reacción se completó después de 1 hora. Posteriormente, se añadió 1 mL de MeOH y la reacción se filtró y se secó *al vacío*. El aceite resultante y luego se purificó por TLC preparatoria (hexano:acetato de etilo, 1:1, $rf = 0,50$) para producir 73 mg, 68 % de rendimiento, de 5,2. UPLC-MS analítica: $t_r = 1,92$ min. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc para $C_{60}H_{97}NO_{16}Si$, 1116,66, encontrado 1116,66.

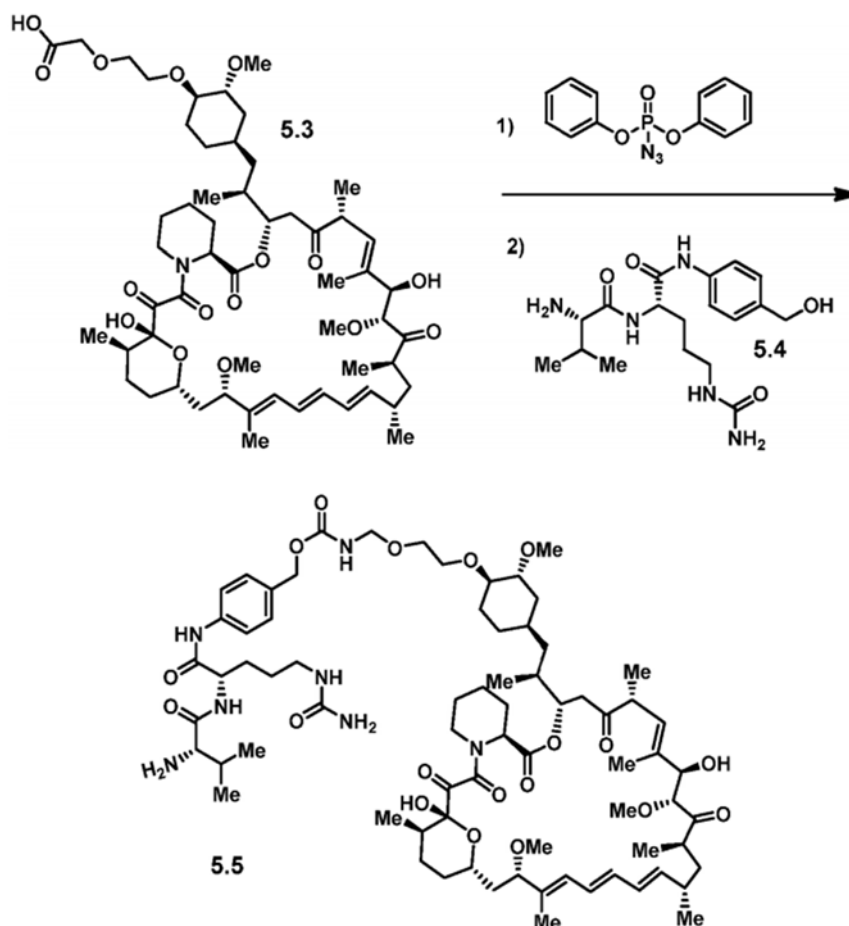
Síntesis ácido 2-(2-[[[(1R,2R,4R)-4-[(2S)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1,0⁴,⁹]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil]oxi]etoxi)acético (5,3):



Un vial de 1 dram equipado con un tapón de rosca con septo y una barra agitadora se cargó con 1 ml de DMF seca, 70 mg (63 μ mol) de 5,2 y 52 mg (1,89 mmol) de difluorotrimetilsilicato de tris(dimetilamino)sulfonio. La reacción agitada a temperatura ambiente se controló mediante CL/EM y se completó después de 20 min. A continuación, la mezcla de reacción se trató con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 M y se extrajo con éter etílico 3 x 5 ml. La capa

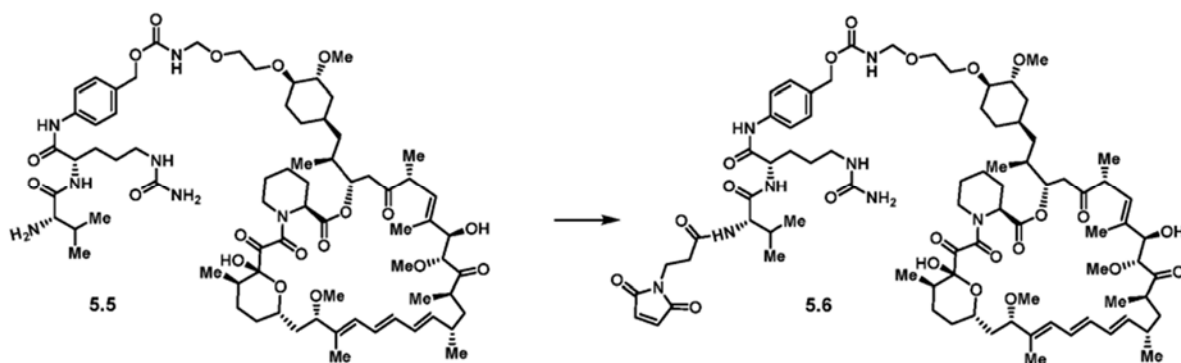
orgánica se secó *al vacío*. A continuación, el aceite resultante se purificó por TLC preparatoria (DCM:MeOH:AcOH, 8,9:1:0,1, *rf* = 0,45) para producir 57 mg, 89 % de rendimiento, de 5.3. UPLC-MS analítica: *t_r* = 1,79 min. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc para C₅₅H₈₅NO₁₆, 1016,59, encontrado 1016,61.

5 *Síntesis de {4-[(2R)-2-[(2R)-2-amino-3-metilbutanamido]-5-(carbamoilamino)pentanamido]fenilo}metil N-[(2-[(1R,2R,4R)-4-[(2S)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11, 36-dioxa-4-azatriciclo[30.3,1,0⁴, 9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil]oxi]etoxi)metil]carbamato (5,5):*



A un vial de 1 dram que contenía 15 mg (15 μ mol) de 5.3 se le añadieron 300 μ l de DMF seguido de 8 μ l (30 μ mol) de difenilfosforil azida y 6 μ l (45 μ mol) de base de Hünig. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. En ese momento, se añadieron a la mezcla de reacción 44 mg (75 μ mol) de 5,4 y 2 μ l (3 μ mol) de dilaurato de dibutilestano a 60 °C. La reacción se agitó durante 2 h más a 60 °C, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se inactivó con 100 μ l de dietilamina y luego se purificó directamente por HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) para producir 10 mg, 47 % de rendimiento, de 5.5. UPLC-MS analítica: *t_r* = 1,49 min. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc para C₇₃H₁₁₃N₇O₁₉, 1392,81, encontrado 1392,80.

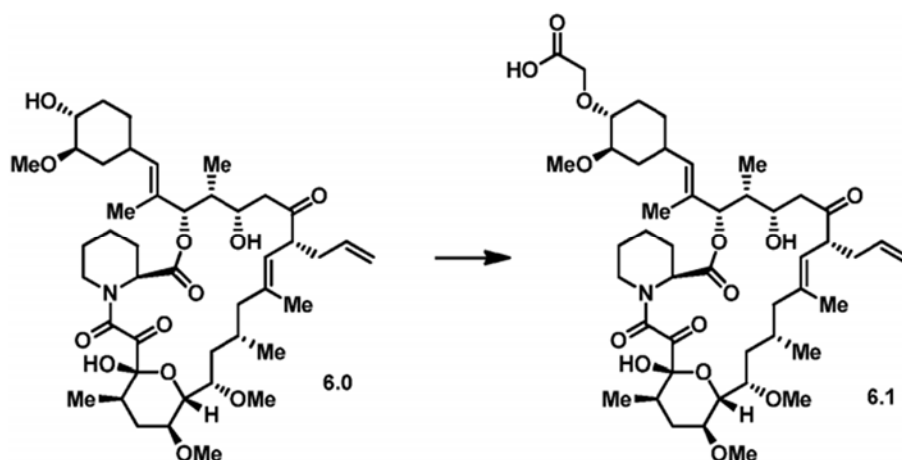
55 *Síntesis de {4-[(2R)-5-(carbamoilamino)-2-[(2R)-2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido]-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil]metilo N-[(2-[(1R,2R,4R)-4-[(2S)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3,1,0⁴, 9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil]oxi]etoxi)metil]carbamato (5,6):*



A un vial de 1 dram que contenía 8 mg (5 μ mol) de 5,5 se le añadieron 100 μ l de DMF seguido de 20 μ l (0,15 mmol) de base de Hünig y ácido 3-maleimidopropiónico 5 mg (18 μ mol) de éster de N-hidroxisuccimida. A continuación, la reacción se agitó durante 30 minutos más a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %) inactivando primero con TFA al 2 %:agua (3 ml) para producir 5 mg, rendimiento del 62 %, de 9,3. UPLC-MS analítica: t_r = 1,69 min. MS (m/z) MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para C₈₀H₁₁₈N₈O₂₂, 1543,84, encontrado 1543,86.

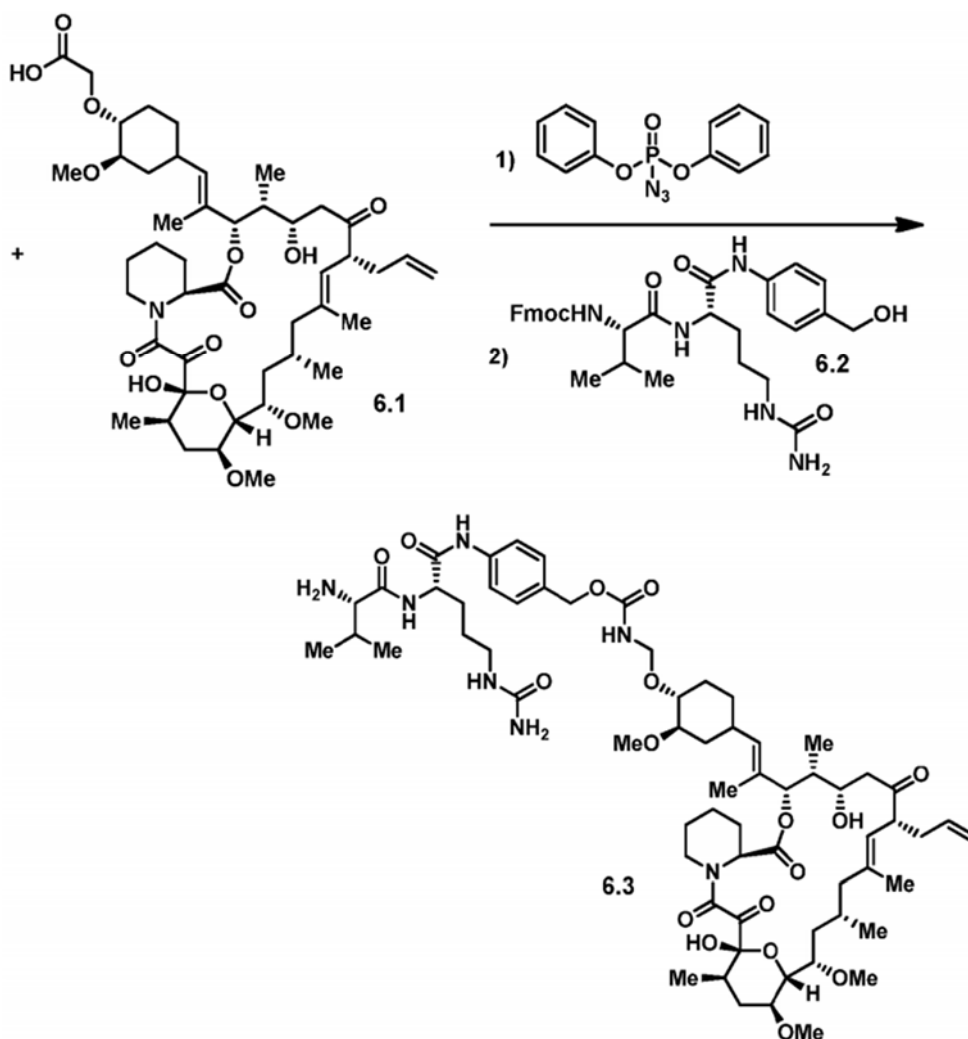
Ejemplo 6: Síntesis de un compuesto enlazador de fármaco de tacrólimus que comprende una unidad MAC

Síntesis de ácido 2-[[[(1R,2R)-4-[(1E)-2-[(1R,9S,12S,13R,14S,17R,18E,21S,23S,24R,25S,27R)-1,14-dihidroxi-23,25-dimetoxi-13,19,21,27-tetrametil-2,3,10,16-tetraoxo-17-(prop-2-en-1-il)-11,28-dioxa-4-azatriciclo[22.3.1,0⁴,⁹]octacos-18-en-12-il]prop-1-en-1-il]-2-metoxiciclohexil]oxi]acético (6.3):



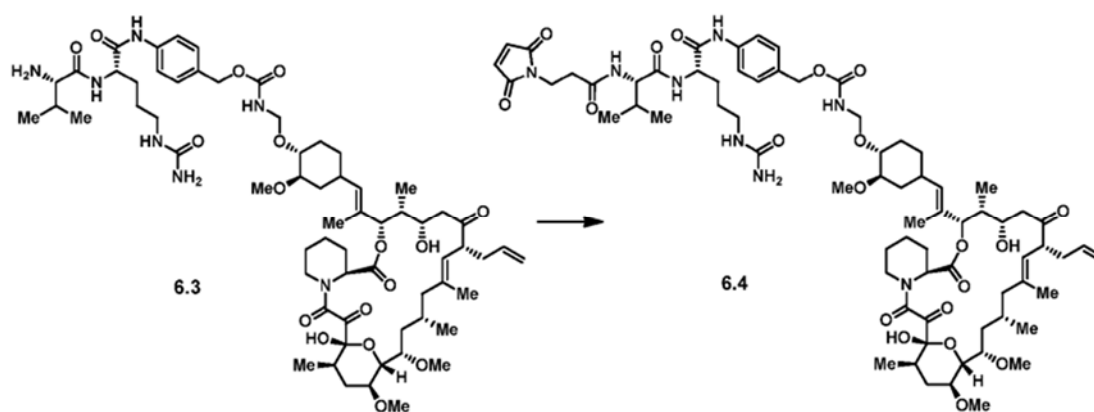
En un vial de 4 dram equipado con un tapón de rosca con septo y un globo de argón se cargaron 3 ml de DCM seco, 13 mg (60 μ mol) de diacetato de rodio y 500 mg (0,6 mmol) de FK-506 (6,1). Posteriormente, se añadieron gota a gota a la mezcla de reacción agitada a 39 °C a través de una bomba de jeringa, 200 μ l (1,2 mmol) de diazoacetato de tercbutilo en 200 μ l de DCM. CL/EM indicó que la reacción se había completado después de 1 hora después de lo cual se añadió 1 ml de MeOH. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y se secó *al vacío*. El aceite resultante se trató con 4 ml de una solución de DCM y ácido trifluoroacético (5:1). La reacción de desprotección se completó después de 1 h como se indica por CL/EM. A continuación, la mezcla de reacción resultante se secó *al vacío* y se purificó por TLC preparatoria (10 % MeOH:DCM, r_f = 0,20) para producir 378 mg, 71 % de rendimiento, de 6,1. UPLC-MS analítica: t_r = 1,89 min. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para C₄₆H₇₁NO₁₄, 862,49, encontrado 862,52.

Síntesis {4-[(2S)-2-[(2S)-2-amino-3-metilbutanamido]-5(carbamoilamino)pentanamido]fenil}metilo N-([[(1R,2R)-4-[(1E)-2-[(1R,9S,12S,13R,14S,17R,18E,21S,23S,24R,25S,27R)-1,14-dihidroxi-23,25-dimetoxi-13,19,21,27-tetrametil-2,3,10,16-tetraoxo-17-(prop-2-en-1-il)-11,28-dioxa-4-azatriciclo[22.3.1,0⁴,⁹]octacos-18-en-12-il]prop-1-en-1-il]-2-metoxiciclohexil]oxi]metil) carbamato (6.3):



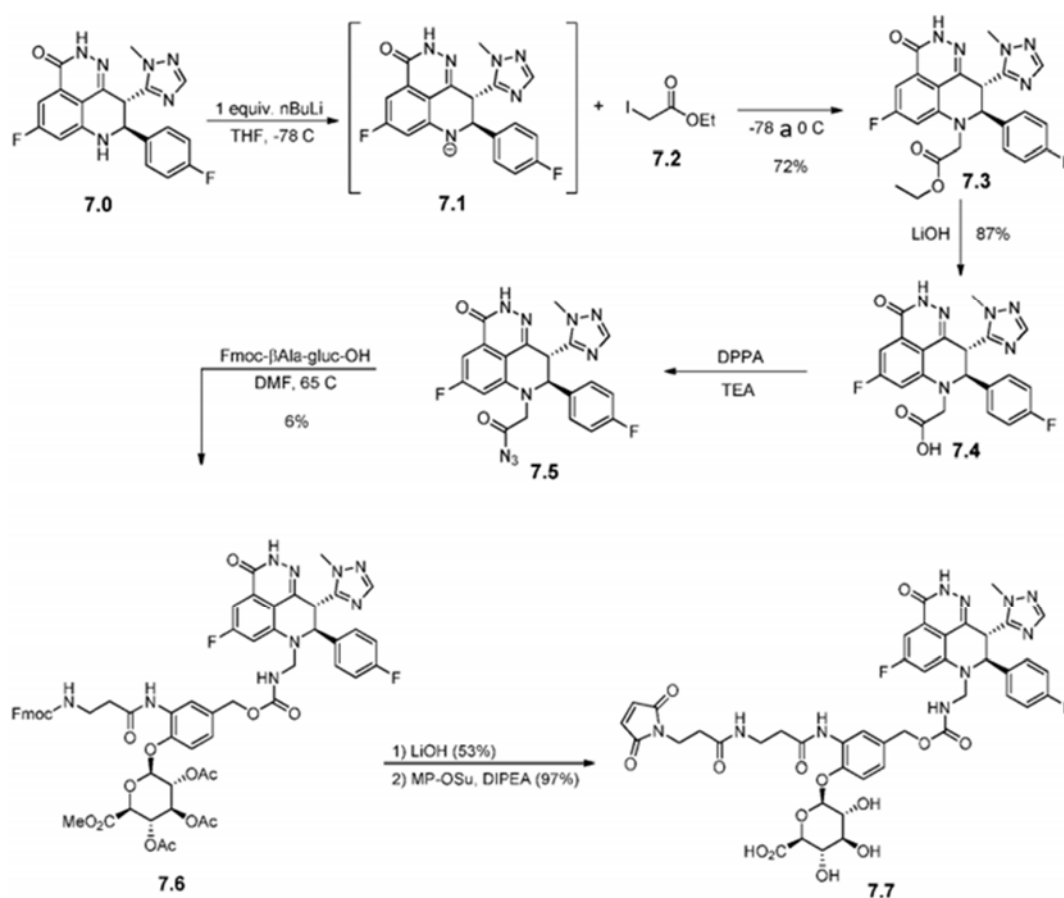
Para a un vial de 4 dram que contenía 50 mg (58 μmol) de 6,1 se le añadieron 300 μl de DMF seguido de 23 μl (87 μmol) de azida de difenilfosforilo y 14 μl (1,2 mmol) de base de Hünig. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se agregaron 52 mg (87 μmol) de 6.2 y 2 μL (3 μmol) de dilaurato de dibutilestano a 60 °C. A continuación, la reacción se agitó durante 2 h más a 60 °C, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. Después de inactivar con 100 ml de dietilamina, la mezcla de reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) para producir 15 mg, 21 % de rendimiento, de 6,3. UPLC-MS analítica: $t_r = 1,82$ min. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc para $C_{74}H_{114}N_{10}O_{22}$, 1238,71, encontrado 1238,70.

La síntesis de {4-[(2S)-5-(carbamoylamino)-2-[(2S)-2-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido]-3-metilbutanamido]pentanamido]fenil}metil-N-[[[(1R,2R)-4-[(1E)-2[(1R,9S,12S,13R,14S,17R,18E,21S,23S,24R,25S,27R)-1,14-dihidroxi-23,25-dimetoxi-13,19,21,27-tetrametil-2,3,10,16-tetraoxo-17-(prop-2-en-1-il)-11,28-dioxa-4-azatriciclo[22.3.1,0⁴,⁹]octacos-18-en-12-il]prop-1-en-1-il]-2-metoxiciclohexil oxil]metil)carbamato (6,4):



A un vial de 1 dram que contenía 4 mg (3 μ mol) de 6.3 se le añadieron 100 ml de DMF seguido de 20 μ l (0,1 mmol) de base de Hünig y 2,5 mg (9 μ mol) de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidopropiónico. Posteriormente, la reacción se agitó durante 30 minutos más a temperatura ambiente, momento en el que la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La reacción se purificó directamente mediante HPLC preparatoria (gradiente 5-95 acetonitrilo/agua 0,05 % TFA) apagando primero la reacción con 2 % TFA:agua (3 ml) para producir 3,4 mg, 85 % de rendimiento, de 6.4. UPLC-MS analítica: t_r = 1,78 min. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc para C₇₁H₁₀₄N₈O₂₀, 1389,74, encontrado 1389,77. La semivida en tampón PBS 0,1 M, pH 7,4 a 37°C determinada según el método del Ejemplo 8 es de 10 horas.

Ejemplo 7: Síntesis de un compuesto enlazador de fármaco que contiene tetrahydroquinolina que comprende una variante de unidad MAC



Síntesis de 2-((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-3-oxo-8,9-dihidro-2H-pirido[4,3,2-deltalazin-7(3H)-il)acetato de etilo (7.3):

Se cargó un matraz secado a la llama con (8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-8,9 - dihidro-2H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-3(7H)-ona (7,0, 49 mg, 129 μ mol) en 2,2 ml de THF anhidro. La solución se agitó a -80 °C bajo N₂ y *n*-butillitio (77 ml, 188 μ mol) a medida que se añadía gota a gota una solución 2,5 M y la reacción resultante se agitó durante 10 min más a -80 °C. Luego se añadió yodoacetato de etilo (7.2, 31 μ l, 258 mmol) como una solución en 1 ml de THF anhidro. Posteriormente, la mezcla de reacción se agitó bajo nitrógeno a 0°C hasta que la CL/EM reveló que se había completado la conversión al producto. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a -80°C y se inactivó con cloruro de amonio saturado, se diluyó con diclorometano y se lavó con bicarbonato de sodio. Luego, la capa acuosa se extrajo con diclorometano y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a sequedad. El producto bruto se purificó sobre sílice a través de una columna Biotage eluyendo con mezclas de metanol:diclorometano para proporcionar 7.3 (43 mg, 72 %). UPLC-MS analítico: *t_r* = 1,79 min, m/z (ES+) encontrado 467,55.

Síntesis de ácido 2-((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-3-oxo-8,9-dihidro-2H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-7(3H)-il)acético (7,4):

Se cargó un matraz con 43 mg de éster 7.3 (92 μ mol) que luego se disolvió en THF (1,5 mL) y MeOH (1,5 mL). La solución resultante se agitó bajo N₂ y se enfrió a 0 °C. Después se añadió gota a gota monohidrato de hidróxido de litio (7,8 mg, 184 mmol) solubilizado en H₂O (1,5 ml). Posteriormente, la reacción se dejó calentar a TA y se agitó durante 2 horas. A continuación, la reacción se inactivó con ácido acético (10,5 ml, 184 μ mol) y se condensó a presión reducida. El residuo se recogió en DMSO mínimo y se purificó mediante CL preparativa para proporcionar 7,4 (35 mg, 87 %). UPLC-MS analítico: *t_r* = 1,47 min, m/z (ES+) encontrado 439,42.

Síntesis de 2-((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-3-oxo-8,9-dihidro-2H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-7(3H)-il)acetilazida (7,5):

Se cargó un matraz con ácido carboxílico libre (7,4, 28 mg, 64 μ mol), que luego se disolvió en THF anhidro (1,3 ml). Se añadió trietilamina (22 μ l, 160 μ mol) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 10 minutos a TA bajo nitrógeno. Luego se añadió azida de difenilfosforilo (14 μ l, 64 μ mol) y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, momento en el cual la UPLC/EM reveló la conversión al producto. A continuación, el material se concentró a presión reducida para proporcionar acil azida 7,5 en bruto, que se llevó adelante sin más caracterización. CL-EM analítica: *t_r* = 12,80 min, m/z (ES+) encontrado 436,16 (M+H-N₂).

Síntesis de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-((((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-3-oxo-8,9-dihidro-2H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-7(3H)-il)metil)carbamoil)oxi)tetilfenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo triacetato (7,6):

A un matraz que contenía acil azida (7,5, 64 μ mol) en DMF anhidro (0,3 ml) se añadió el compuesto Fmoc- β Ala-glucurónido de alcohol bencílico que contiene glucurónido descrito anteriormente (Bioconjugate Chem. 2006, 17, 831-840) (96 mg, 128 μ mol). Posteriormente, la mezcla de reacción se calentó y se agitó a 65°C para promover la transposición de la acil azida al isocianato con el subsiguiente atrapamiento para formar el grupo funcional carbamato. Después de 2 horas, se añadió dilaurato de dibutilestano catalítico. La agitación continua a 65°C durante 5 horas dio como resultado una modesta conversión en producto. La reacción se diluyó en acetonitrilo y dimetilsulfóxido y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar 7,6 (4,4 mg, 6 %). UPLC-MS analítico: *t_r* = 2,27 min, m/z (ES+) encontrado 1185,29.

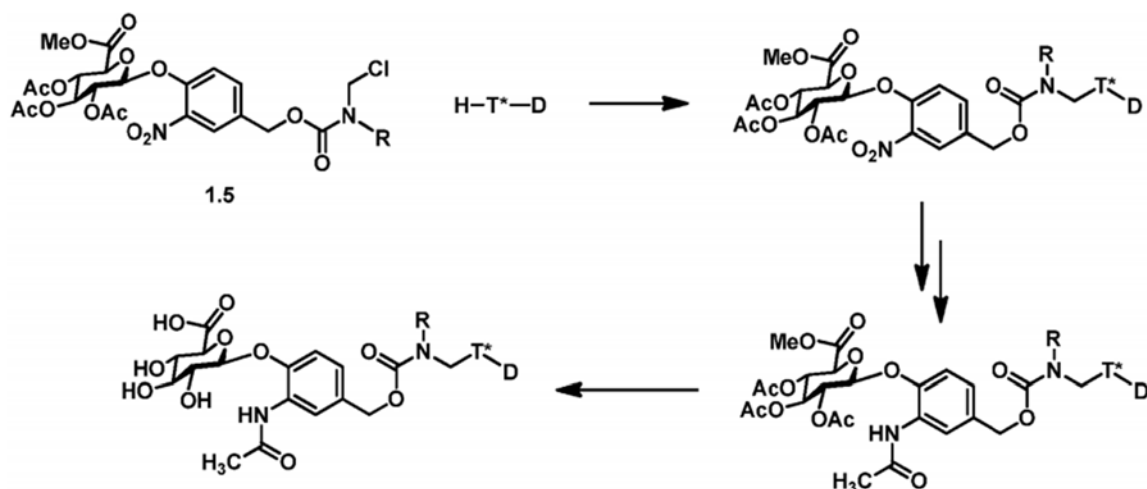
Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)-4-((((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-3-oxo-8,9-dihidro-2H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-7(3H)-il)metil)carbamoil)oxi)metilfenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (7,7):

Un matraz cargado con 4,4 mg de intermedio conector de glucurónido protegido 7,6 (3,7 mmol) se disolvió en THF (0,13 ml) y MeOH (0,13 ml). La solución resultante se agitó bajo N₂ y se enfrió a 0 °C. A continuación, se añadió gota a gota LiOH · H₂O (0,9 mg, 22 μ mol) solubilizado en H₂O (0,13 ml). Después, la reacción se dejó calentar a TA y se agitó durante 4 horas más. A continuación, la mezcla de reacción se inactivó con ácido acético (1,3 ml, 22 μ mol) y se condensó a presión reducida. El residuo obtenido se recogió en DMSO mínimo y se purificó mediante CL preparativa para proporcionar el enlazador de glucurónido desprotegido (1,6 mg, 53 %). UPLC-MS analítico: *t_r* = 1,20 min, m/z (ES+) encontrado 822,49. Se disolvió éster de NHS de maleimidopropionilo (0,8 mg, 2,9 μ mol) en DMF anhidra (0,19 μ mol) y se añadió a un matraz que contenía el enlazador de glucurónido globalmente desprotegido (1,6 mg, 1,9 μ mol). Luego se añadió DIPEA (1,7 ml, 9,5 μ mol) y la reacción se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, la reacción se diluyó en acetonitrilo y dimetilsulfóxido y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar el conector de fármaco 7,7 (2 mg, 97 %). UPLC-MS analítico: *t_r* = 1,41 min, m/z (ES+) encontrado 973,43.

Ejemplo 8: Preparación de sistemas modelo de enlace de fármaco que tienen Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras que liberan compuestos que contienen hidroxilo y tiol como fármacos sin modelo.

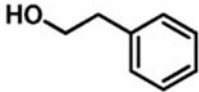
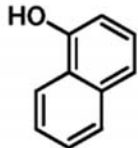
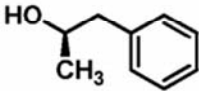
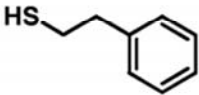
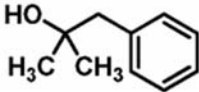
Se prepararon Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras ejemplares con unión covalente a unidades de fármaco que incorporan estructuras de fármacos modelo mediante síntesis de N-clorometilamina de acuerdo con el siguiente esquema, en el que cada Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora preparada está compuesta por un resto auto-inmolador de

estructura XVID (es decir, -PABA(gluc)-) y una Unidad MAC:



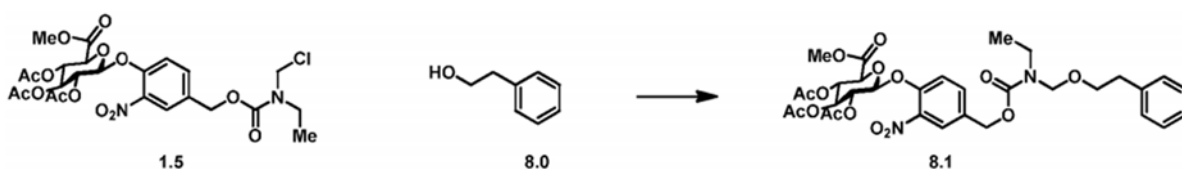
en la que las variaciones en fármaco libre R y D-T*-H, que se usa en la síntesis y se libera tras la activación del resto auto-inmolador PABA(gluc), son los siguientes en la Tabla 1:

Tabla 1. Compuestos que contienen hidroxilo y tior como fármacos sin modelo con variación en la sustitución de Unidad de MAC

D-T*-H		R
		-CH ₂ CH ₃ -PEG
		-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
		

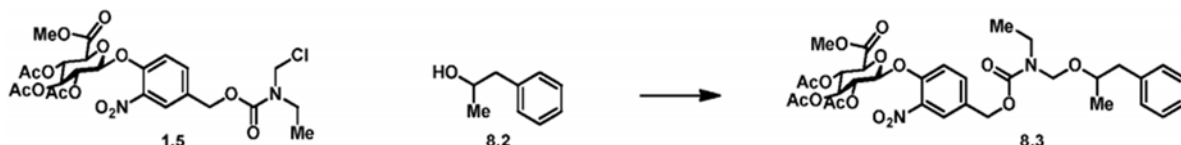
Procedimiento general para la alquilación de un nucleófilo de DT-H con 1,5:* A un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación, tabiques y globo de argón y cargado con 5 mL de DCM seco, 1 Se añadieron 5 mmoles de DT*-H, 5 mmoles de base de Hünig seguidos de 2 mmoles de compuesto de N-clorometilamina 1,5 a través de una jeringa de una sola vez. La reacción se controló por CL/EM hasta que se consumió el material de partida DT*-H; las reacciones se completaron típicamente en 2 h. La mezcla de reacción se secó *al vacío* mediante rotoevaporación. A continuación, el aceite resultante se purificó mediante Biotage FCC con gradiente de acetato de etilo y hexanos.

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((etil(fenetoximetil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-pirano-3,4,5-triilo (8,1):



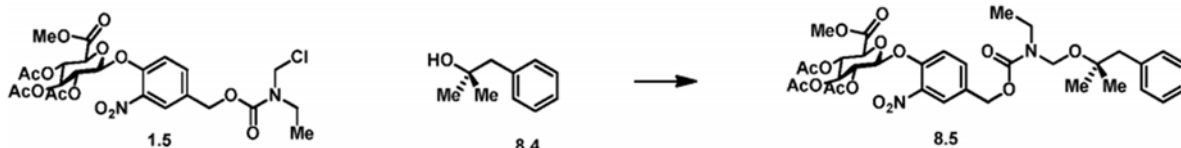
Seguendo el procedimiento general de alquilación: utilizando (621 mg, 1,05 mmol) de 1,5, (250 μ L, 2,1 mmol) de 8,0 y (939 μ L, 5,25 mmol) de base de Hünig proporcionó 615 mg de 8,1, 85 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{32}H_{38}N_2O_{15}$ 691,23, encontrado 691,25, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,80 (s, 1H), 7,52 (dd, J = 9,2, 8,1 Hz, 1H), 7,37-7,30 (m, 1H), 7,27 (t, J = 3,5, 2H), 7,23-7,14 (m, 3H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,20 (d, J = 5,9, 1H), 5,12 (d, J = 5,4, 2H), 4,71 (d, J = 14,0, 2H), 4,20 (d, J = 11,3, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,65 (dt, J = 12,5, 3,5, 2H), 3,39-3,26 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,06 (s, 6H), 1,14-1,06 (m, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((etil(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,3):



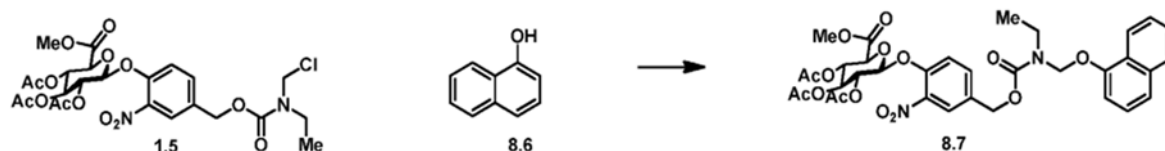
Seguendo el procedimiento general de alquilación: utilizando (105 mg, 0,175 mmol) de 1,5, (47 μ L, 0,35 mmol) de 8.2 y (156,6 μ L, 0,87 mmol) de base de Hünig proporcionó 111 mg de 8.3, 90 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{33}H_{40}N_2O_{15}$ 705,68, encontrado 705,65, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,80 (s, 1H), 7,52 (dd, J = 9,2, 8,1 Hz, 1H), 7,37-7,10 (m, 5H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,25-5,01 (m, 3H), 4,80-4,63 (m, 2H), 4,19 (d, J = 14,0, 2H), 4,20 (d, J = 8,78, 1H), 3,73 (d, J = 2,74, 3H), 3,3-3,03 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,60 (dd, J = 13,11, 4,64, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,06 (s, 6H), 1,14-1,06 (t, J = 7,37, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(4-(((etil(((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,5):



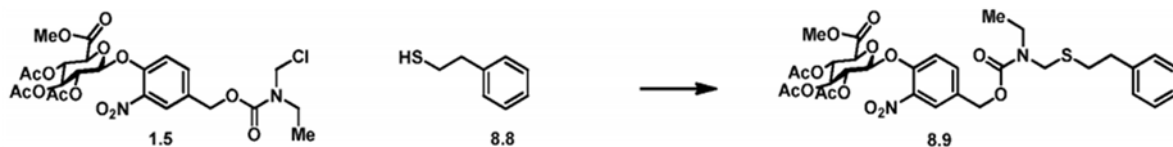
Seguendo el procedimiento general de alquilación: Utilizando (534 mg, 0,885 mmol) de 1,5, (260 μ L, 0,17 mmol) de 7,5 y (795 μ L, 4,4 mmol) de base de Hünig proporcionaron 390 mg de 7,6, 61 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{34}H_{42}N_2O$ 15 719,26, encontrado 719,24, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,80 (d, J = 7,2 1H), 7,52 (dd, J = 9,7, 8,4 Hz, 1H), 7,40-7,29 (m, 1H), 7,25-7,13 (m, 5H), 5,37-5,26 (m, 3H), 5,12-5,09 (m, 2H), 4,81 (d, J = 32,0, 2H), 4,18 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,41-3,31 (m, 2H), 2,81-2,72 (d, J = 16,9, 2H), 2,11 (m, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (s, 6H), 1,19-1,10 (m, 9H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((etil((naftalen-1-iloxi)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonilo)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,7):



Seguendo el procedimiento general de alquilación: utilizando (791 mg, 1,3 mmol) de 1,5, (377 mg, 2,6 mmol) de 8,6 y (1,7 ml, 6,5 mmol) de base de Hünig proporcionaron 768 mg de 8,7, 82 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{34}H_{36}N_2O_{15}$ 713,39, encontrado 713,37, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8,19 (dd, J = 16,3, 8,5 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 7,2 1H), 7,47 (m, 3H), 7,34 (t, J = 10,5 2H), 7,25 (m, 1H), 7,18 (m, 2H), 6,9 (dd, J = 39,5, 6,7 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 14,9, 2H), 5,30 (m, 3H), 5,21-5,02 (m, 3H), 4,18 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,64-3,49 (m, 2H), 2,31 (s, 2H), 2,12 (s, 3H), 2,06 (s, 6H), 1,32-1,18 (m, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((etil((fenetil)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,9):



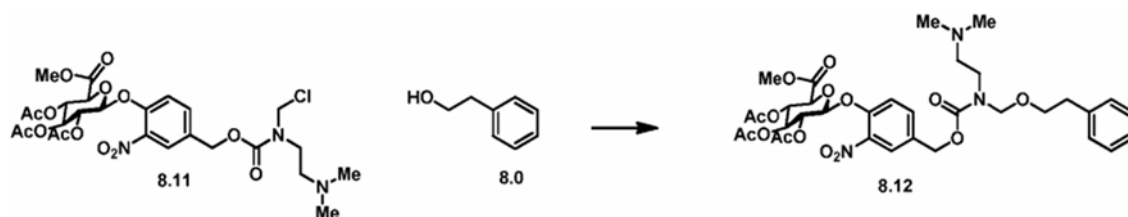
Siguiendo el procedimiento general de alquilación: Utilizando (43 mg, 0,070 mmol) de 1,5, (19 μ l, 0,140 mmol) de 8,8 y (62 μ l, 6,5 mmol) de base de Hünig proporcionó 42 mg de 8,9, 86 % de rendimiento. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₃₂H₃₈N₂O₁₄S 707,20, encontrado 707,18, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,79 (s, 1H), 7,50 (dd, J = 10,2, 8,7 Hz, 1H), 7,37-7,08 (m, 6H), 5,38-5,26 (m, 3H), 5,17-5,08 (m, 3H), 4,47 (d, J = 31,3, 2H), 4,17 (d, J = 9,6, 2H), 4,20 (d, J = 11,3, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,40 (m, 2H), 2,90-2,75 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,06 (d, J = 2,8, 6H), 1,14 (t, J = 6,6, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(dimetilamino)etil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,11)



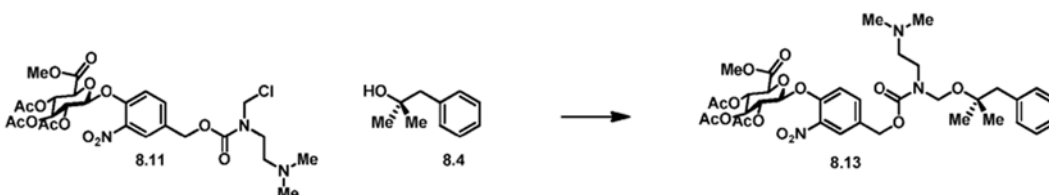
El compuesto 8,11 se sintetizó usando el procedimiento para 1,5. Utilizando (150 mg, 0,2 μ m) 8,10 (para la síntesis de 8,10 véase Bosslet et al., 1998, J. Med. Chem. 41:3572) proporcionó 155 mg de 8,11, 95 % de rendimiento. Las muestras analíticas de UPLC se preparan con MeOH para extinguir el cloruro reactivo en 8,1. UPLC-MS analítico: t_r = 1,40 min, MS (m/z) [$M + Na$]⁺ calc para C₂₇H₃₇N₃O₁₅ 666,21, encontrado 666,19.

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(dimetilamino)etil)(fenetoximetil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,12):



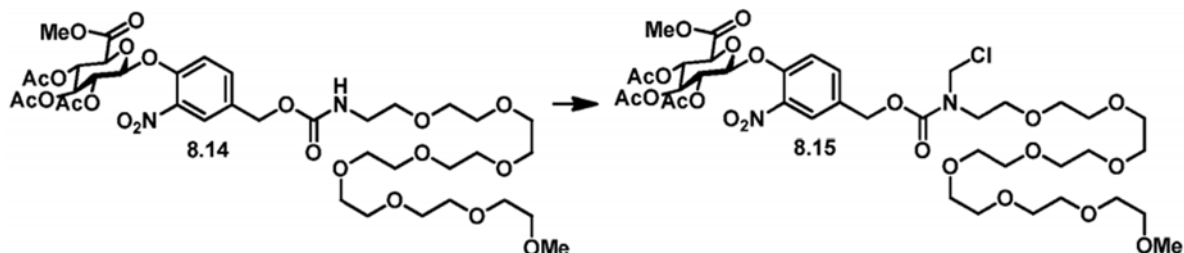
Siguiendo el procedimiento general de alquilación: utilizando (97 mg, 0,150 mmol) de 8,11, (37 μ l, 0,30 mmol) de 8,0 y (102 μ L, 1,1 mmol) de base de Hünig proporcionó 76 mg de 8,12, 72 % de rendimiento. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,84-7,77 (m, 1H), 7,53 (dd, J = 46,5, 9,6 Hz, 1H), 7,35 (t, J = 8,2, 1H), 7,30-7,14 (m, 5H), 5,38-5,26 (m, 3H), 5,21 (t, J = 6,21, 3H), 5,12 (d, J = 7,86, 2H), 4,76 (d, J = 15,7, 2H), 4,22 (dd, J = 13,2, 7,4, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,70-3,54 (m, 5H), 3,0 (t, J = 5,9, 1H), 2,83 (t, J = 6,6, 2H), 2,78 (s, 6H), 2,59 (s, 2H), 2,12 (s, 3H), 2,06 (d, J = 2,19, 6H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(((2-(dimetilamino)etil)((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,13):



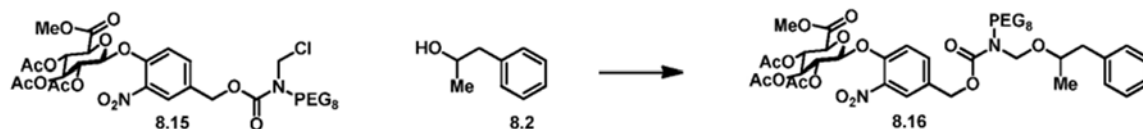
Siguiendo el procedimiento general de alquilación: Utilizando (150 mg, 0,23 mmol) de 8,11, (104 μ l, 0,69 mmol) de 8,4 y (102 μ l, 1,1 mmol) de base de Hünig proporcionaron 118 mg de 8,13, 67 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{36}H_{47}N_4O_{15}$ 762,30, encontrado 762,32, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,80 (d, J = 24,6 1H), 7,53 (dd, J = 12,3, 8,4 Hz, 1H), 7,34 (t, J = 11,1, 1H), 7,26-7,13 (m, 5H), 5,38-5,26 (m, 3H), 5,21-5,09 (m, 3H), 4,47 (d, J = 27,2, 2H), 4,20 (t, J = 9,74, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,55 (td, J = 27,2, 7,7 2H), 2,84 (t, J = 9,7, 1H), 2,76 (t, J = 14,9, 2H), 2,84 (t, J = 9,0, 1H), 2,51 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,05 (s, 9H), 1,16 (d, J = 12,2, 6H).

Síntesis de triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(metoxicarbonil)-6-(4-(4-(metoximetil)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22,25,28-nona-4-azanonacosil)-2-nitrofenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,15)



El compuesto 8,15 se sintetizó usando el procedimiento para 1,5. Utilizando (500 mg, 0,56 mM) 8,14 (para la síntesis de 8,14 véase Bosslet et al., 1998, *J. Med. Chem.* 41:3572) proporcionó 516 mg de 8,15, 98 % de rendimiento. Las muestras analíticas de UPLC se preparan con MeOH para extinguir el cloruro reactivo en 8,15. UPLC-MS analítico: t_r = 1,91 min, MS (m/z) $[M + Na]^+$ calc para $C_{40}H_{62}N_2NO_{23}$ 961,36, encontrado 921,40.

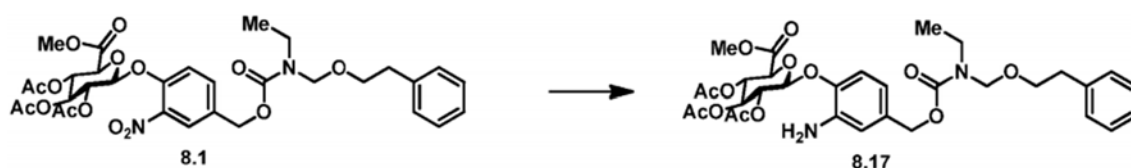
Síntesis de triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(metoxicarbonil)-6-(2-nitro-4-(3-oxo-4-(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)-2,7,10,13,16,19,22,25,28-nona-4-azanonacosil)fenoxi)tetrahidro-2H-pirano-3,4,5-triilo (8,16):



Siguiendo el procedimiento de alquilación general: utilizando (60 mg, 0,064 mmol) de 8,15, (17 μ l, 0,128 mmol) de 8,2 y (41 μ l, 0,32 mmol) de base de Hünig proporcionó 51 mg de 8,16, 84 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{48}H_{70}N_2O_{23}$ 1043,44, encontrado 1043,47, ^1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7,79 (s, 1H), 7,53 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,35 (dd, J = 9,9, 6,1 Hz, 1H), 7,26-7,07 (m, 5H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,20-5,16 (m, 3H), 4,80-4,70 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,66-3,49 (m, 32H), 3,45 (t, J = 7,08, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,21 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,64 (dd, J = 13,1, 5,7, 1H), 2,12 (s, 3H), 2,05 (d, J = 2,12, 6H), 1,14 (m, 3H).

Procedimiento general para la reducción del grupo arilo nitro a amina de arilo: un vial de 1 dram equipado con una barra agitadora y un septum de goma se cargó con 1 mmol de compuesto arilo nitro y una mezcla de MeOH:AcOH 10:1 (v/v %) para una concentración final de 0,2 M. Luego se añadió zinc activado, 20 mmol, en una cucharada y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por CL/EM hasta su finalización, lo que generalmente ocurrió dentro de los 30 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y el sólido resultante se lavó con exceso de MeOH. A continuación, el filtrado se destiló azeotrópicamente hasta sequedad con tolueno *al vacío*. A continuación, el aceite crudo se purificó mediante Biotage FCC con un gradiente de acetato de etilo y hexanos.

La síntesis de diacetato de (2S,3S,4R,5R,6S)-6-(2-amino-4-(((etil(fenetoximetil)carbamoyl)oxi)metil)fenoxi)-5-hidroxi-2-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (8,17):



Seguendo el procedimiento de reducción general: en 400 µl de MeOH:AcOH 8,1 (52 mg, 0,075 mmol) se trató con zinc (96 mg, 1,5 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 43 mg de 8,17, 86 % de rendimiento. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc C₃₂H₄₀N₂O₁₃ 661,25, encontrado 661,23, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,30-7,25 (m, 2H), 7,23-7,13 (m, 3H), 6,86 (dd, *J* = 13,6, 7,02, 1H), 6,66 (m, 2H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,00 (m, 3H), 4,77 (d, *J* = 15,5, 2H), 4,15 (d, *J* = 9,6, 1H), 3,80 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,68 (t, *J* = 7,02, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,36-3,24 (m, 1H), 2,90-2,79 (m, 1H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (d, *J* = 3,8 6H), 1,09 (q, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((etil(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,18):



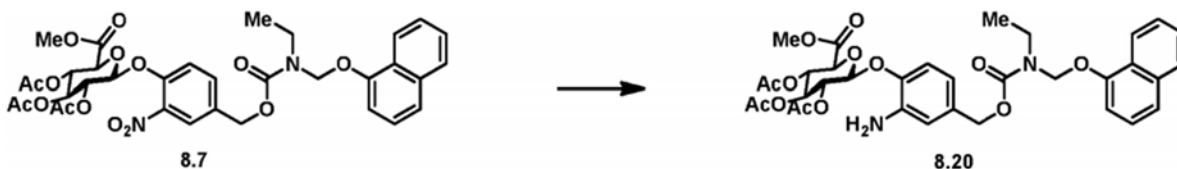
Seguendo el procedimiento de reducción general: En 350 µl de MeOH:AcOH 8,3 (49 mg, 0,070 mmol) se trató con zinc (88 mg, 1,4 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 44 mg de 8,18, 93 % de rendimiento. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc C₃₄H₄₂N₂O 13 675,27, encontrado 675,28, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,92 (s, 1), 7,41-6,85 (m, 7H) 5,44-5,21 (m, 3H), 5,1 (m, 3H), 4,77 (d, *J* = 5,8, 2H), 4,18 (d, *J* = 8,7, 1H), 3,74 (d, *J* = 5,8, 2H), 3,73-3,45 (m, 2H), 3,34-3,23 (m, 2H), 2,89-2,78 (m, 2H), 2,45 (s, 1H), 2,21 (s, 2H), 2,00 (m, 9H), 1,09 (t, *J* = 6,7, 3H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((etil(((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,19):



Seguendo el procedimiento de reducción general: Compuesto 8,5 (56 mg, 0,074 mmol) en 390 µl de MeOH:AcOH se trató con zinc (90 mg, 1,42 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 44 mg de 8,19, 93 % de rendimiento. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc C₃₄H₄₄N₂O₁₃ 689,28, encontrado 689,30, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,26-7,14 (m, 5H), 6,86 (t, *J* = 7,0, 1H), 7,47 (m, 2H), 5,38-5,26 (m, 3H), 5,00 (s, 3H), 4,87-4,74 (d, *J* = 38,0, 2H), 4,14 (m, 1H), 3,80 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,49 (s, 6H), 3,35 (m, 2H), 2,77 (d, *J* = 22,0, 2H), 2,08 (s, 3H), 2,05 (d, *J* = 4,8, 6H), 1,13 (t, *J* = 6,7, 3H).

Síntesis de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((etil(((naftalen-1-iloxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo triacetato (8,20):



Seguendo el procedimiento de reducción general: En 630 µl de MeOH:AcOH 8,7 (89 mg, 0,125 mmol) se trató con zinc (160 mg, 2,50 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 78 mg de 8,20, 88 % de rendimiento. MS (*m/z*) [*M* + *H*]⁺ calc C₃₄H₃₈N₂O₁₃ 683,24, encontrado 683,21, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,23 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,48 (m, 2H), 7,36-7,27 (m, 1H), 7,26-6,40 (m, 5H), 4,4 (d, *J* = 36,0 2H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,00 (m, 3H), 4,15 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,66-3,45 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,05 (m, 9H), 3,60 (m, 1H), 1,25 (dt, *J* = 30,0, 7,84, 1H).

Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((etil(((feniltio)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8,21):



Siguiendo el procedimiento de reducción general: en 320 μ l de MeOH:AcOH 8,9 (45 mg, 0,064 mmol) se trató con zinc (81 mg, 1,27 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 38 mg de 8,21, 84 % de rendimiento. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₃₄H₄₀N₂O₁₂S 677,23, encontrado 677,20, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,81 (s, 1H), 7,51 (dd, J = 18,1, 8,6 Hz, 1H), 7,35-7,27 (m, 3H), 7,25-7,08 (m, 3H), 5,38-5,27 (m, 3H), 5,14 (m, 3H), 4,49 (d, J = 34,0, 2H), 4,20 (d, J = 7,90, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,50 (s, 2H), 3,46-3,37 (m, 2H), 3,95-2,71 (m, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,06 (d, J = 2,8, 6H), 1,15 (t, J = 6,6, 3H).

10

15 *Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((2-(dimetilamino)etil)(fenetoximetil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8.22):*



Siguiendo el procedimiento general de reducción: Compuesto 8,12 (51 mg, 0,070 mmol) en 380 μ l de MeOH:AcOH se trató con zinc (97 mg, 1,52 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 40 mg de 8,22, 78 % de rendimiento. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₃₄H₄₅N₃O₁₃ 704,30, encontrado 704,27, ¹H RMN (400 MHz, DMSO) δ = 7,29-7,11 (m, 5H), 6,82 (t, J = 6,8, 1H), 6,62 (d, J = 1,8, 1H), 6,50 (t, J = 7,3, 1H), 5,52-5,42 (m, 2H), 5,13-5,01 (m, 2H), 4,72-4,63 (m, 5H), 3,62 (s, 3H), 3,54 (m, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 2,40-2,29 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,99 (s, 6H).

30

35 *Síntesis de triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-amino-4-(((2-(dimetilamino)etil)(((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8.23):*



Siguiendo el procedimiento general de reducción: En 330 μ l de MeOH:AcOH 8,13 (50 mg, 0,066 mmol) se trató con zinc (84 mg, 1,31 mmol). La purificación de la mezcla de reacción produjo 46 mg de 8,23, 92 % de rendimiento. MS (m/z) [$M + H$]⁺ calc C₃₆H₄₉N₃O₁₃ 732,33, encontrado 732,29, ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,39 (s, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,19-7,11 (m, 4H), 6,89 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,40-5,25 (m, 3H), 5,15-4,98 (m, 3H), 4,85 (d, J = 32,0 Hz, 2H), 3,73 (s, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,77 (t, J = 24,0, 2H), 2,11 (m, 15H), 1,21 (s, 6H).

50

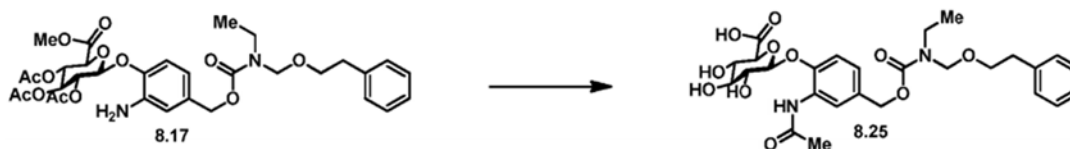
55 *Síntesis de triacetato de (2S,3S,4S,5R,6S)-2-(metoxicarbonil)-6-(2-amino-4-(3-oxo-4-(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metilo)-2,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-4-azanonacosil)fenoxi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (8.24):*



En un vial de 1 dram equipado con tapón de rosca con septo y un globo de argón se cargó con 8,16 (56 mg, 0,048 mmol), dicloruro de estaño (54 mg, 0,288 mmol), piridina (37 μ l, 480 mmol) y 240 μ l de etanol. La reacción se agitó durante 16 horas, momento en el que la CL/EM mostró el consumo de los materiales de partida. La mezcla de reacción se filtró sobre un lecho de Celite y el filtrado se purificó mediante cromatografía en columna flash para producir 22 mg de 8,24 como un aceite transparente, 44 %. EM (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{34}H_{44}N_2O_{13}$ 1013,46, encontrado 1013,43.

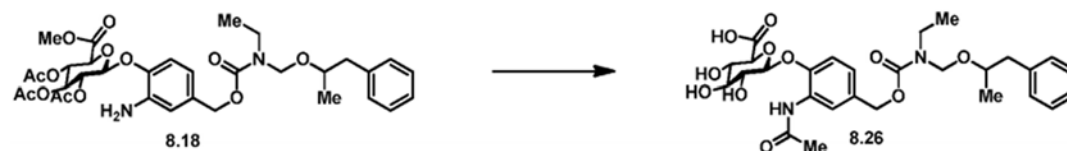
Procedimiento general para la formación de acetamida seguida de desprotección con hidróxido de litio y arilglucurónido. A un vial de 1 dram equipado con una barra agitadora y una tapa revestida de PTFE se le añadió 1 mmol de glucurónido de anilina, 5 mmol de ácido acético anhídrido, 6 mmol de base de Hünig y 5 ml de diclorometano a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante CL/EM hasta su finalización, lo que generalmente ocurrió en 1 hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se destiló azeotrópicamente hasta sequedad con tolueno *al vacío*. A continuación, el aceite crudo se trató con 1 ml de MeOH 1:1 y una solución acuosa saturada de LiOH a temperatura ambiente. La reacción de desprotección por hidrólisis se controló mediante CL/EM y generalmente se completó en 1 hora. A continuación, la mezcla de reacción se purificó usando HPLC preparatoria (gradiente 5-95 de acetonitrilo/agua, TFA al 0,05 %).

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((etil(fenetoximetil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-pirano-2-carboxílico (8.25):



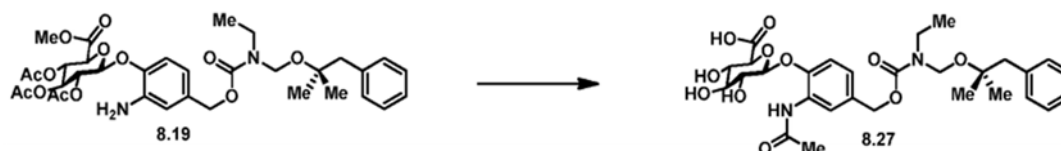
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8,17 (63 mg, 0,090 mmol) se convirtió en 40 mg de 8.25, 80 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{27}H_{34}N_2O_{11}$ 563,22, encontrado 563,18.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((etil(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.26):



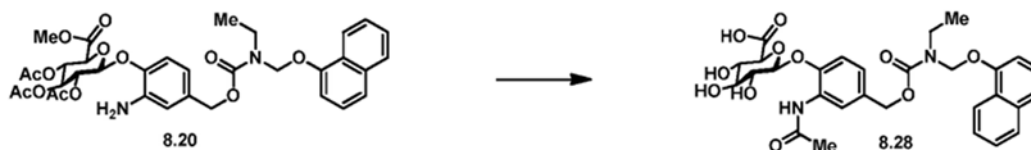
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8,16 (56 mg, 0,078 mmol) se convirtió en 33 mg de 8.24, 73 % de rendimiento. EM (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{28}H_{36}N_2O_{11}$ 577,23, encontrado 577,25.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((etil(((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.27):



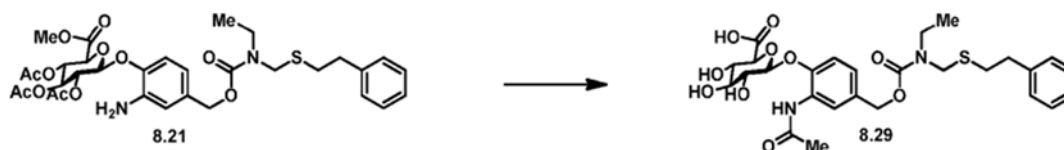
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8,19 (29 mg, 0,040 mmol) se convirtió en 18 mg de 8,27, 78 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{29}H_{38}N_2O_{11}$ 591,25, encontrado 591,27.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((etil((naftalen-1-iloxi)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.28):



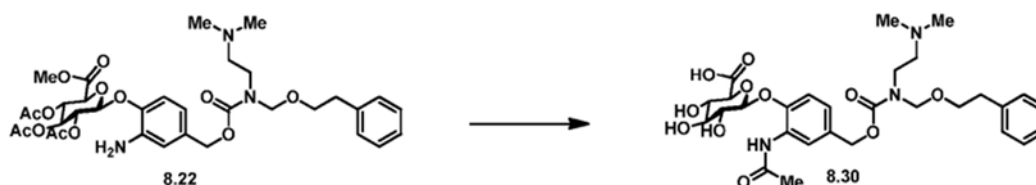
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8.20 (197 mg, 0.270 mmol) se convirtió en 103 mg de 8.28, 66 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{29}H_{32}N_2O_{11}$ 585,20, encontrado 585,23.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((etil((fenetiltio)metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.29):



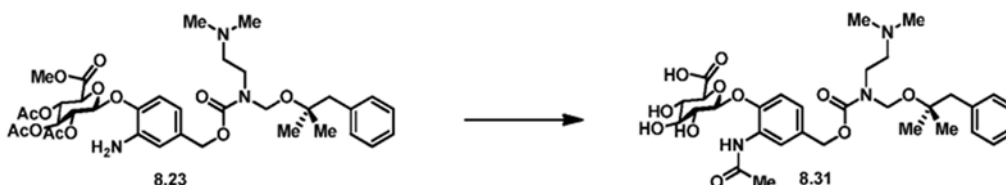
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8.21 (48 mg, 0.067 mmol) se convirtió en 32 mg de 8.29, 71 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{27}H_{34}N_2O_{10}S$ 579,79, encontrado 579,76.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((2-(dimetilamino)etil)(fenetoximetil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.30):



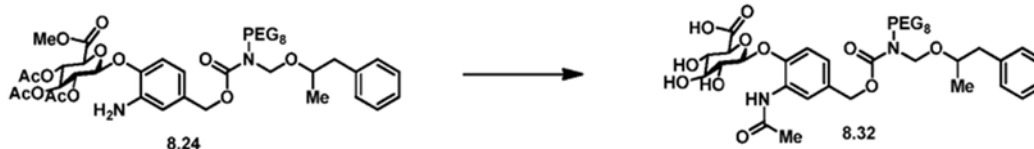
Siguiendo el procedimiento general: el compuesto 8.22 (45 mg, 0.062 mmol) se convirtió en 28 mg de 8.30, 75 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{29}H_{39}N_3O_{11}$ 606,26, encontrado 606,25.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(((2-(dimetilamino)etil)((2-metil-1-fenilpropan-2-il)oxi))metil)carbamoil)oxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.31):



Siguiendo el procedimiento general: Compuesto 8.23 (50 mg, 0.066 mmol) se convirtió en 31 mg de 8.31, 72 % de rendimiento. EM (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{31}H_{43}N_3O_{11}$ 634,29, encontrado 634,32.

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-acetamido-4-(3-oxo-4-(((1-fenilpropan-2-il)oxi)metil)-2,7,10,13,16,19,22,25,28-nona-4-azanonacosil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (8.32):



Seguendo el procedimiento general: el compuesto 7.26 (52 mg, 0,050 mmol) se convirtió en 28 mg de 7.34, 62 % de rendimiento. MS (m/z) $[M + H]^+$ calc $C_{29}H_{32}N_2O_{11}$ 915,43, encontrado 915,41.

Ejemplo 9: Estabilidad *in vitro* de sistemas modelo que tienen Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras, cada una de las cuales comprende una Unidad MAC, o variante de la misma, a la hidrólisis espontánea

Los productos N-acetilo finales del Ejemplo 8 contienen Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras, cada una con una unidad de carbamato de metileno de Fórmula I unida covalentemente a una unidad de fármaco a partir de un compuesto de fármaco modelo, que se ha cerrado con acetilo en lugar de una Unidad Estiradora. Como tales, los compuestos representan compuestos modelo de Fármaco-Enlazador. La estabilidad de esos restos a la hidrólisis espontánea se determinó usando el siguiente procedimiento general.

Procedimiento general para probar la estabilidad de Fármaco-Enlazador: Los productos N-acetilo finales del Ejemplo 8 se disolvieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato 0,1 M, pH 7,4, en un vial a 37 °C. Las muestras de CL/EM se prepararon añadiendo alícuotas de 2 μ l de solución de compuesto incubado a 100 μ l de MeOH en un vial de HPLC. Cada conjugado se analizó cada 24 h durante 7 días.

Para los compuestos de enlace de fármaco modelo que tienen una unidad de carbamato de metileno de Fórmula I con R como etilo o PEG, el alcohol alifático secundario (en sustitución de un fármaco libre que contiene alcohol alifático) proporcionó compuestos de enlace de fármaco modelo (8.26 y 8.32, respectivamente) que no mostró signos de degradación después de 7 días. El compuesto modelo Fármaco-Enlazador del compuesto de fármaco modelo que contiene tiol que tiene una unidad de carbamato de metileno con R como etilo (8.29) tampoco mostró signos de degradación después de 7 días. Con R como etilo y la Unidad de fármaco de naftol (en sustitución de un fármaco que contiene alcohol aromático) proporcionó un compuesto enlazador de fármaco modelo que tiene una unidad MAC unida covalentemente a una Unidad de fármaco (8.28) que tenía una excelente estabilidad, que era indistinguible durante el curso del estudio al correspondiente compuesto de fármaco-enlazador modelo (8.26) del alcohol alifático secundario. Ese resultado fue inesperado ya que una unidad MAC que incorpore el heteroátomo de oxígeno de un alcohol aromático puede no ser tan hidrolíticamente estable como una que incorpore un alcohol secundario debido a su menor pK_a y, por lo tanto, a la mejor capacidad de grupo saliente del aril-OH en comparación con el alifático-OH. Por el contrario, los alcoholes alifáticos primarios y terciarios que sustituyeron a las drogas libres que contienen alcohol alifático primario y secundario proporcionaron compuestos de Fármaco-Enlazador modelo (8.25 y 8.27, respectivamente) con R como etilo que tenían una estabilidad adecuada pero no en la misma medida que la observada para el compuesto de fármaco-enlazador modelo del alcohol secundario. Inesperadamente, cuando R es dimetilaminoetilo en lugar de etilo, los compuestos de fármaco modelo de alcohol primario y terciario proporcionaron compuestos de enlace de fármaco modelo (8.25 y 8.27) que demostraron tener la misma excelente estabilidad que el compuesto de Fármaco-Enlazador modelo (8.26) del alcohol alifático secundario.

Creemos que la estabilidad de un conector de fármaco puede mejorarse mediante la sustitución del nitrógeno carbamato de su unidad de carbamato de metileno con una Unidad básica como se define en el presente documento que incluye, entre otros, un resto dimetilaminoalquilo.

Ejemplo 10: Estabilidad *in vitro* de compuestos de enlace de fármaco que tienen una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora frente a la hidrólisis espontánea de su unidad de carbamato de metileno. (El ejemplo 10 no cae dentro del alcance de la presente invención para el compuesto 7,7)

Estabilidad de la variante de la unidad MAC en restos de enlazadores de fármacos representados por los restos correspondientes dentro de los compuestos de enlazador de fármacos 4,5 (triptolida), 5,6 (everolimus), 6,4 (tricolimus) y 7,7 (BMN-673) de los Ejemplos 4, 5, 6 y 7 respectivamente, se evaluaron de la siguiente manera.

Para la evaluación de la estabilidad *in vitro* del compuesto 7,7, este compuesto de Fármaco-Enlazador se convirtió en su conjugado de N-acetilcisteína (NAC-7,7), que proporciona un LDC modelo con NAC que sirve como sustituto de una Unidad de Ligando de anticuerpo dirigido. Para ese fin, se diluyeron ocho microlitros de una reserva de DMSO 8 mM de compuesto enlazador de fármaco en solución salina tamponada con fosfato (0,39 ml). El resto de maleimida en cada compuesto de Fármaco-Enlazador se inactivó luego con N-acetilcisteína (0,8 μ l, solución madre 100 mM), y el material se almacenó en una incubadora a 37 °C. Se extrajeron alícuotas en varios puntos de tiempo hasta 14 días y se analizaron mediante UPLC-MS para determinar la integridad del enlazador de fármacos.

La prueba de estabilidad se realizó como en el Ejemplo 9. No se observó ninguna indicación de degradación del enlazador de fármaco después de 14 días de incubación en PBS 0,1 M, pH 7,4, a 37°C para los compuestos de enlace de fármacos

modelo 4,5, 5,6 y 6,4, y el conjugado modelo NAC- 7,7 en PBS 4 mM, pH 7,4, 37°C. En el caso de NAC-7,7, se observó la amida de ácido correspondiente de la hidrólisis del resto de succinimida. Inesperadamente, el compuesto de Fármaco-Enlazador modelo (8.26), que incorpora el alcohol alifático secundario como sustituto de un alcohol alifático secundario que contiene libre, tuvo una mayor estabilidad en comparación con la estabilidad aceptable del Fármaco-Enlazador Compuesto 6,4, que se derivó de un fármaco libre que contiene alcohol alifático secundario (tricolimus). Además, se descubrió que el compuesto de Fármaco-Enlazador 5,6, que se deriva de un fármaco libre que contiene alcohol alifático primario (everolimus), tiene una estabilidad hidrolítica aún mejor en comparación con el compuesto de fármaco-enlazador modelo (8.23), que se derivó del alcohol alifático primario como sustituto de un fármaco libre que contiene alcohol alifático primario.

Por lo tanto, cada compuesto de fármaco modelo proporcionó un resto enlazador de fármaco que tiene una unidad de carbamato de metileno de estabilidad aceptable, cuyo grado parece ser independiente de la identidad del heteroátomo T* y, por lo tanto, del grupo funcional en el fármaco a través del cual se conjuga, pero también puede depender del resto de la estructura de la Unidad de Drogas. Los resultados con unidades de carbamato de metileno que están sustituidas en N con un resto básico proporcionan restos enlazadores de fármacos de estabilidad excepcional.

Ejemplo 11: Estabilidad *ex vivo* de un conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora frente a la hidrólisis espontánea de su unidad de carbamato de metileno. (El ejemplo 11 no cae dentro del alcance de la presente invención para compuestos en los que R es distinto de H)

ADC con cuatro restos de revestimiento de fármaco del compuesto de fármaco-enlazador 1.3 (es decir, una composición de ADC que tiene una carga de fármaco media de aproximadamente 4), preparado como en el Ejemplo 14, se incubó a 1 mg/mL en alícuotas estériles de 200 µL de plasma de rata y ratón comercialmente disponible (Bioreclamation). Se incubaron alícuotas a 37 °C y se congelaron a -80 °C en cada punto de tiempo. Una vez completadas las incubaciones, las muestras se descongelaron y se añadieron 50 µL de resina IgSelect neta (GE Healthcare) a cada alícuota. Las muestras se rotaron a 4 °C durante al menos tres horas y se transfirieron a una placa de filtración de 96 pocillos (Seahorse) en un colector de vacío. La resina se lavó tres veces con PBS 3 mM (Gibco) y se eluyó mediante centrifugación con dos alícuotas de 50 µL de tampón de elución IgG (Pierce). Los ADC purificados se neutralizaron con 15 µL de Tris 1 M (pH 7,4) y se desglucosilaron a 37 °C durante una hora usando PNGaseF (New England Biolabs). Se resolvió una inyección de 40 µL de cada muestra en una columna de polihidroxietilo A SEC (PolyLC) en línea con un espectrómetro de masas QTOF (Agilent) de modo que el ADC pudiera analizarse en un estado intacto nativo (ver Valliere-Douglass, John et al., "Native Intact Mass Determination of Antibodies Conjugated with Monomethyl Auristatin E and F at Interchain Cysteine Residues" Analytical Chemistry 2012, 84, 2843-2849). Se desconvolucionó el espectro de masas sin procesar del ADC intacto, y se integró el área debajo de cada pico desconvolucionado para determinar una proporción promedio de fármaco-anticuerpo para cada muestra. La figura 1 muestra la estabilidad plasmática del conjugado de fármaco AE en función de la relación fármaco-anticuerpo determinada por el método de espectroscopia de masas anterior a lo largo del tiempo en días.

Los datos de espectro de masas confirman que cualquier pérdida de fármaco que se haya producido se debió a la eliminación completa del enlazador de fármaco de la Unidad de Ligando y no a la degradación del enlazador atribuible a la inestabilidad hidrolítica de la Unidad MAC. Los datos del espectro de masas también demuestran que después de la hidrólisis completa del sistema de anillo de succinimida de la fracción succinimida de la Unidad Estiradora a la fracción ácido-amida correspondiente, la relación fármaco:anticuerpo permaneció constante.

Los datos de estabilidad para varias construcciones descritas en el presente documento que tienen una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno unida covalentemente a una unidad de fármaco correspondiente en estructura a un fármaco o fármaco modelo se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de estabilidad de la unidad de ensamblaje auto-inmoladora

Fármaco o Fármaco modelo (carbamato R)	Construcción (grupo funcional del fármaco)	Vida media de degradación relativa observada por CL/EM
1,3 (H)	Conjugado cAC10-AE (2°OH)*	Ninguno observado
4,5 (Et)	Compuesto triptólido-enlazador (2°OH)	Ninguno observado
5,6 (H)	Compuesto everolimus-enlazador (2°OH)	7 días
6,4 (H)	Compuesto Tricolimus-enlazador (1°OH)	Ninguno observado
7,7 (H)	Conjugado NAC-(BMN-673) (2°NH)	Ninguno observado
8,25 (Et)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (1°OH)	7 días
8,30 (BU)**	Compuesto de enlace de fármaco modelo (1°OH)	Ninguno observado

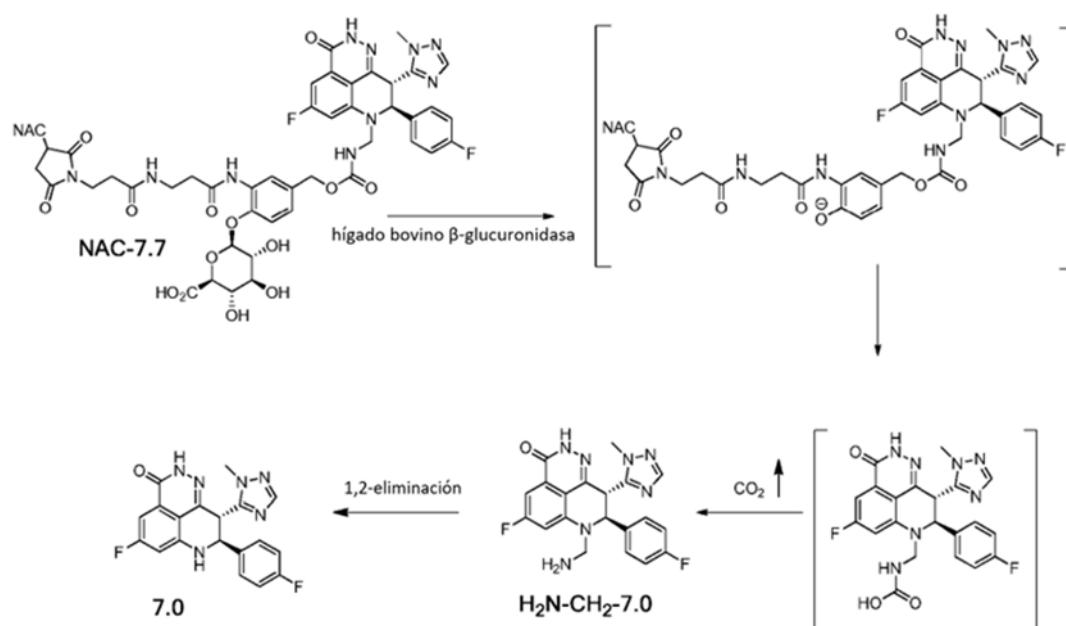
(Continuación)

Fármaco o Fármaco modelo (carbamato R)	Construcción (grupo funcional del fármaco)	Vida media de degradación relativa observada por CL/EM
8,26 (Et)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (2°OH)	Ninguno observado
8,32 (PEG ₈)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (2°OH)	Ninguno observado
8,27 (Et)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (3°OH)	7 días
8,31 (BU)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (3°OH)	Ninguno observado
8,28 (Et)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (Ar-OH)	Ninguno observado
8,29 (Et)	Compuesto de enlace de fármaco modelo (1°SH)	Ninguno observado
* Incubado en plasma de rata o ratón a 37 °C, todos los demás en PBS 0,1 M, pH 7,4, a 37 °C		
** UB es -CH ₂ CH ₂ -N(CH ₃) ₂		

Ejemplo 12. Liberación de fármaco libre o compuestos modelo para fármacos que contienen tiol, fármacos que contienen alcohol alifático primario, secundario y terciario, y fármaco que contiene alcohol fenólico a partir de conjugados de NAC que tienen una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora compuesta por una unidad MAC o una variante de la misma posterior a la activación de esa unidad por glucuronidasa

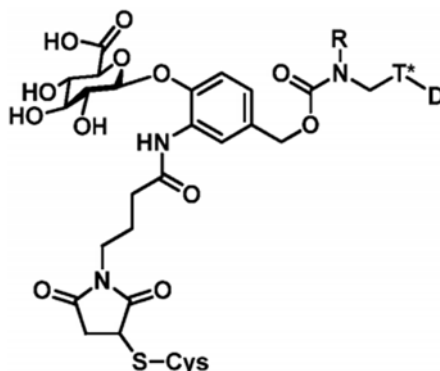
Se evaluó de la siguiente manera: Se preparó una reserva de enzimas disolviendo β -glucuronidasa tipo B-1 (hígado bovino, 1,644,000 unidades/g sólido) en tampón de acetato de sodio 100 mM de pH 5 hasta una concentración de trabajo de 0,5 mg/ml. Se añadieron cinco microlitros de reserva de fármaco enlazador 8 mM del compuesto 7,7 a 12,5 μ l de DMSO, 26,3 μ l de solución salina tamponada con fosfato y 6,75 μ l de N-acetilcisteína 100 mM. A continuación, el enlazador inactivado se diluyó con 0,45 ml de reserva de enzima. A continuación, la reacción enzimática se incubó a 37 °C, con múltiples puntos de tiempo tomados a 1, 10, 20 y 40 minutos. La muestra de cada punto de tiempo consistió en 20 μ l de reacción diluidos en 5 volúmenes de metanol enfriado con hielo y enfriados a -20 °C hasta que se retiraron todas las muestras. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12,000 g durante 5 minutos y se analizaron 20 μ l de sobrenadante mediante UPLC-MS. Después de 20 minutos de digestión enzimática, el enlazador de fármaco se había consumido por completo. A los 40 minutos, la mayor parte del material estaba libre de fármaco, lo que indica una liberación del fármaco efectivamente completa desde el sistema conector.

En contraste con el conjugado cAC10-2,0, que liberó rápidamente el fármaco libre de la unidad MAC sin intermedio detectable después de la autoinmolación de la Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora, Del conjugado NAC-7,7 mostró la acumulación de un intermedio, NH₂-CH₂-7,0, cuya estructura se muestra en el siguiente esquema.



También se estudiaron las liberaciones de "fármacos libres" sustitutos de los conjugados de NAC que incorporan los

restos del Enlazador de Fármacos del Ejemplo 8. Esos compuestos se prepararon reemplazando el grupo de protección N-acetilo con N-3-(propionoil)-maleimida, que introduce un precursor de la Unidad Estiradora de maleimida, en los intermedios amino usados para la preparación de los compuestos conectores de fármacos modelo 8.23-8.30. A continuación, los restos de maleimida se apagan con N-acetil-cisteína como se describió anteriormente para la preparación de NAC-7,7. Los conjugados de NAC derivados de los intermedios amino del Ejemplo 8 tienen la estructura generalizada



en la que T* es el heteroátomo de oxígeno o azufre del grupo funcional hidroxilo o sulfhidrilo del alcohol primario o compuesto que contiene tiol o el heteroátomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del compuesto que contiene alcohol secundario o terciario o del compuesto que contiene fenoles de la Tabla 3. El tiempo para completar la liberación de D-T*-H con variaciones en R y el compuesto liberado se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Eficiencia de liberación de fármaco libre posterior a la activación de la autoinmolación

DT*-H (compuesto de ligador de fármaco modelo correspondiente)	R	Tiempo hasta la liberación del 100 % (min.)
Alcohol primario (8.25)	-CH ₂ CH ₃	15
Alcohol primario (8.30)	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	15
Alcohol secundario (8.26)	-CH ₂ CH ₃	45
Alcohol secundario (8.32)	-PEG ₈	15
Alcohol terciario (8.27)	-CH ₂ CH ₃	15
Alcohol terciario (8.31)	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	15
Alcohol aromático (8.28)	-CH ₂ CH ₃	25
Tiol (8.29)	-CH ₂ CH ₃	40

Ejemplo 13: Suministro intracelular de fármaco libre de citotóxicos a células cancerosas diana liberadas desde una unidad MAC de un conjugado de anticuerpo y fármaco debido a la activación condicional de su Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora.

Se encontró que las células Lovo (línea celular de adenocarcinoma de colon humano) que se pusieron en contacto con 8 conjugados de cOKT9-7,7 cargados con fármaco, que se dirigen a las células CD70⁺, que tienen el resto enlazador de fármaco del Ejemplo 7 y preparado de la manera del Ejemplo 14, tienen mayor cantidades de fármaco libre intracelular (es decir, el compuesto 7,0) que cuando se pone en contacto con una cantidad equivalente de fármaco libre no dirigido como se muestra en la Figura 2. Esos resultados indican que el ADC se dirige a las células deseadas y libera eficazmente el fármaco libre tras su internalización celular.

Ejemplo 14: Preparación de ADC que tienen una unidad MAC y sus citotoxicidades *in vitro*

Los ligandos de anticuerpos dirigidos cAC10 y h1F6 se describen en los documentos US 8,257,706 y US 2009/0148942, respectivamente. cAC10 se dirige a las células CD30⁺, que incluye Karpas 299, L540cy y L-428. h1F6 se dirige a las células CD70⁺, que incluyen 786-O, L-428 y Caki-1.

Para las composiciones de ADC que tienen una carga de fármaco homogénea de 8, la reducción completa de los enlaces disulfuro intercatenarios del ligando del anticuerpo dirigido se logró mediante el método del documento US 2003/00883263. Brevemente, el anticuerpo dirigido (5-10 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 μ M se trató con 10 eq. tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) neutralizada a pH 7,4 usando fosfato dibásico de potasio e incubada a 37°C durante 45 minutos. La separación de agentes de bajo peso molecular se logra mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex G25.

La reducción parcial del ligando del anticuerpo dirigido para proporcionar composiciones de ADC que tienen una carga de fármaco promedio de aproximadamente 4 se logró usando el método de US 2005/0238649. Brevemente, el anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato con EDTA 1 μ M, pH 7,4, se trató con 2,1 eq. TCEP y luego se incubó a 37°C durante unos 45 minutos. El valor de tior/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducida a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tior por reacción con DTNB y determinación de la absorbancia a 412 nm.

Los compuestos de fármaco-enlazador se conjugaron con los ligandos de anticuerpos dirigidos total y parcialmente reducidos usando el método de US 2005/0238649. Brevemente, se añadió un compuesto de Fármaco-Enlazador en DMSO al anticuerpo reducido en PBS con EDTA junto con un exceso de DMSO hasta un codisolvente de reacción total del 15 %. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió a la mezcla un exceso de n-acetilcisteína para extinguir todos los grupos maleimida sin reaccionar. La mezcla de reacción se purificó desalinizando usando resina Sephadex G25 en tampón PBS.

La concentración de proteína de la composición de ADC resultante se determinó a 280 nm. El fármaco unido se cuantificó mediante análisis usando HPLC de interacción hidrófoba (HIC).

cAC10-1006 y hF16-1006, a los que se hace referencia en las siguientes tablas, es el anticuerpo quimérico AC10 y el anticuerpo F16 humanizado, respectivamente, conjugados con monometil auristatina E (MMAE) en su extremo N a través de un grupo funcional carbamato a un resto auto-inmolador val-cit-PABA que tiene la Fórmula XVIII y se usó como control. Los ADC resultantes se ensayaron frente a múltiples líneas celulares para determinar la actividad *in vitro*, cuyos resultados se resumen en las Tablas 5 y 6.

Tabla 6. Actividad citotóxica *in vitro* de ADC preparados con enlazadores MAC; los valores representan CI_{50} s en ng/mL.

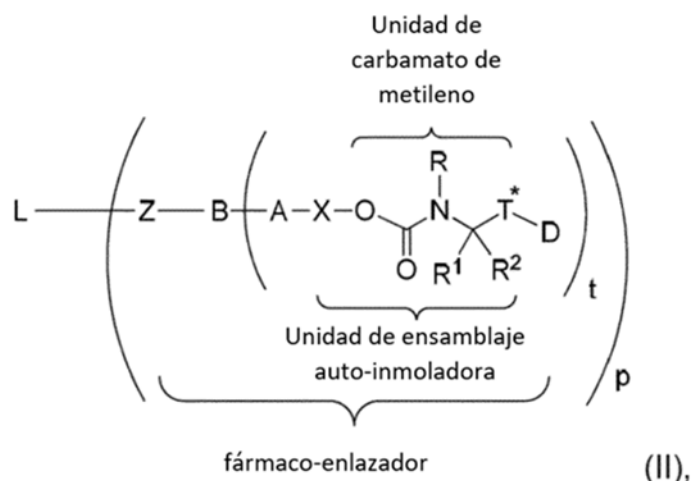
ADC	Dr/Ab	Karpa CD30+CD70- 299	L540cy CD30+CD70 (bajo)	786-0 CD70+	Caki-1 CD70+
h1F6-1.3	3,6	>1000	>1000*	>1000**	19
cAC10-1.3	3,7	0,8	3	>1000	>1000
cAC10-1006	4,0	1	8	>1000	>1000
h1F6-1006	4,0	>1000	>1000	>1000**	7

Tabla 7. Actividad citotóxica *in vitro* de ADC preparados con enlazadores MAC; los valores representan CI_{50} s en ng/mL.

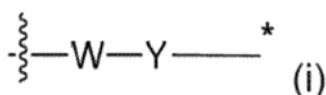
ADC	Dr/Ab	Karpa 299 CD30+ CD70-	L540cy CD30+ CD70-	L-428 CD30 (medio) CD70 (bajo)	HEL92,1,7 CD30-CD70-
cAC10-2.0	8,0	0,4	3	65	>1000
cAC10-1006	4,0	0,6	9	>1000*	>1000
h1F6-1006	4,0	>1000	>1000	>1000*	>1000
*Se sabe que las líneas celulares son resistentes a MMAE					
**Se sabe que las líneas celulares son resistentes a las auristatinas					

REIVINDICACIONES

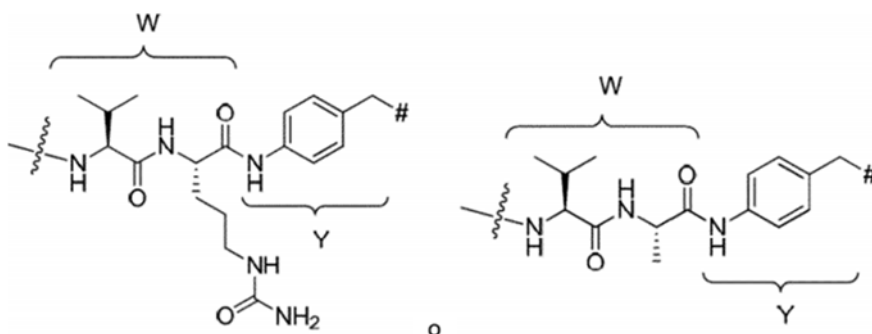
1. Un conjugado de ligando-fármaco compuesto, que tiene la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que
 L es una Unidad de Ligando, que es un agente de dirección que es capaz de unirse específicamente a un resto diana;
 Z es una Unidad Estiradora que actúa para conectar la Unidad de Ligando a una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora;
 B es una Unidad de Ramificación opcional que proporciona un enlace covalente entre la Unidad Estiradora y dos, tres o cuatro Unidades de Ensamblaje Auto-Inmoladoras y está presente cuando el subíndice t es mayor que 1 y está ausente cuando el subíndice t es 1;
 A es una Unidad Conectora opcional que está unida covalentemente con la Unidad Estiradora o la Unidad de Ramificación opcional y está unida covalentemente a un resto auto-inmolador activable;
 D es una Unidad de Fármaco correspondiente a un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo, en el que el grupo funcional se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno indicada;
 T* es el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional; X es el resto auto-inmolador activable;
 donde el resto auto-inmolador activable (X) tiene la estructura de Fórmula (i)

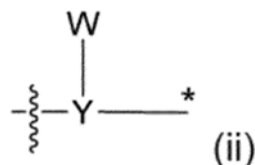


donde la línea ondulada indica unión covalente de W a A, B o Z dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B y el asterisco (*) indica unión covalente de Y a la unidad de carbamato de metileno y donde;
 W es una Unidad de Activación; e
 Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora,
 en la que la activación de la autoinmolación de Y da como resultado la liberación del fármaco,
 en el que dicha activación se realiza mediante la escisión enzimática de un enlace covalente entre W y Y,
 en la que la escisión enzimática es preferentemente por un tumor asociado proteasa,
 en la que la proteasa asociada al tumor es preferiblemente cathepsina B,
 en la que -W-Y- está representado por:



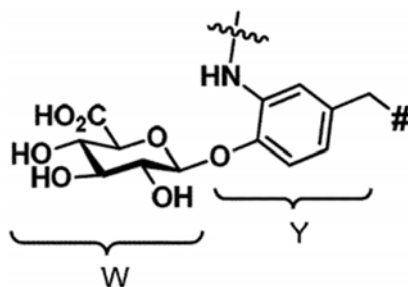
en donde la línea ondulada hacia el nitrógeno de W indica un enlace covalente con Z, A o B, dependiendo de la presencia

o ausencia de A y/o B, y la marca de almohadilla (#) indica la unión covalente del carbono bencílico de Y a la unidad de carbamato de metileno; o
donde el resto auto-inmolador activable (X) tiene la estructura de Fórmula (ii):



en donde la línea ondulada indica unión covalente de Y a A, B o Z dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y el asterisco (*) indica la unión covalente de Y al resto carbamato de metileno, y donde;
W es una Unidad de Activación, en donde la Unidad de Activación es un azúcar; e
Y es una Unidad Espaciadora Auto-Inmoladora,

en donde la activación de la autoinmolación de Y da como resultado la liberación del fármaco, y
en donde dicha activación se realiza mediante la escisión enzimática de un enlace covalente entre W e Y por una glicosidasa, en particular una glucuronidasa, donde -Y(W)- está representado por la estructura de:



en donde la línea ondulada adyacente al nitrógeno de Y indica unión covalente de Y a Z, A o B, dependiendo de la presencia o ausencia de A y/o B, y la marca almohadilla (#) indica unión covalente del bencílico
carbono de Y a la unidad carbamato de metileno;

R, R¹ y R² son independientemente
hidrógeno; el subíndice t varía de 1 a 4;

y

el subíndice p es un número entero que va de 1 a 16.

2. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 1, en el que D es una unidad de fármaco correspondiente a un fármaco que contiene alcohol alifático, y en el que la unión de D dentro del compuesto conjugado ligando-fármaco es a través del heteroátomo de oxígeno de la función hidroxilo del alcohol alifático.

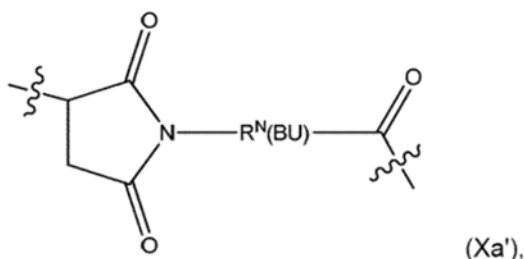
3. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 1, en el que D es una unidad de fármaco correspondiente a un fármaco que contiene alcohol aromático, y en el que la unión de D dentro del compuesto conjugado ligando-fármaco se realiza a través del heteroátomo de oxígeno del grupo funcional hidroxilo del alcohol aromático.

4. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que B está ausente y el subíndice t es 1.

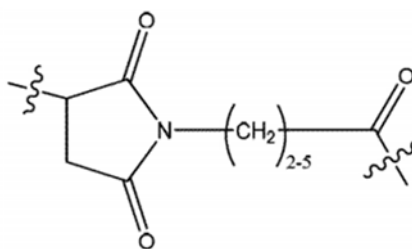
5. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la Unidad Estiradora (Z) está compuesto por un resto succinimida o un resto ácido-amida y, opcionalmente, una Unidad Básica, en el que el resto succinimida o ácido-amida está unido a un átomo de azufre de la Unidad de Ligando.

6. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 5, en el que la Unidad Estiradora (Z) tiene la estructura de:

(a) Fórmula Xa':



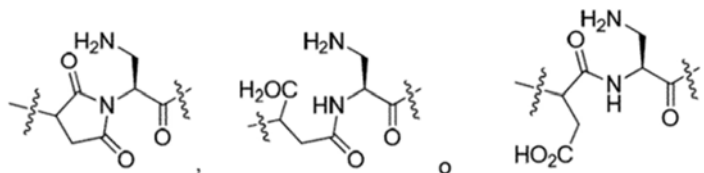
o la Unidad Estiradora (Z) tiene la estructura de:



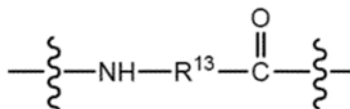
en la que la línea ondulada adyacente a la succinimida el sistema de anillos indica unión covalente a un átomo de azufre de la Unidad de Ligando;

la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión dentro del resto del Compuesto Conjugado de Fármaco Ligando; y R^N es alquileo -C₂-C₅, en el que el alquileo está sustituido por una Unidad Básica (UB), en la que UB es $-(CH_2)_xNH_2$, $-(CH_2)_xNHR^{OP}$, o $-(CH_2)_xN(R^{OP})_2$, en el que x es un número entero que oscila de 1-4; y R^{OP} es alquilo C₁-C₆; o

(b)

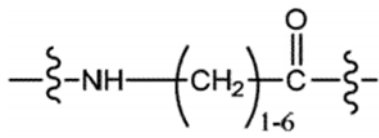


7. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 6, en el que la Unidad Conectora (A) está presente y tiene la estructura de:



en la que la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión covalente al resto auto-inmolador X activable, y la otra línea ondulada indica unión a B, si está presente, o a Z si B está ausente; y

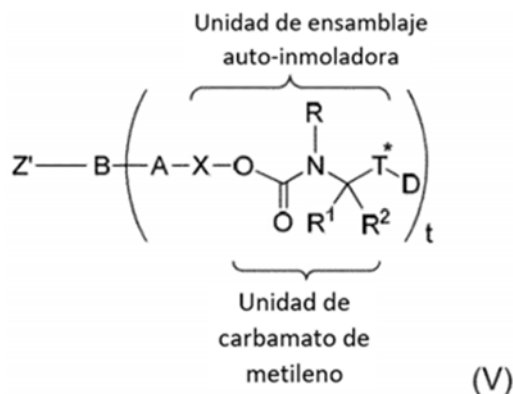
R^{13} es -alquileo C₁-C₆-, -carbociclo C₃-C₈-, -arileno-, -heteroalquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, o -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, donde la Unidad Conectora (A) tiene preferiblemente la estructura de:



8. El compuesto conjugado ligando-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la unidad ligando es un anticuerpo.

9. Un compuesto de Fármaco-Enlazador, en el que el compuesto comprende una Unidad de Fármaco y una Unidad Enlazadora,

en el que la Unidad de Enlazadora se compone de una Unidad de Ensamblaje Auto-Inmoladora que tiene una unidad de carbamato de metileno y un resto auto-inmolador activable en el que la unidad de fármaco está unida covalentemente a la unidad de carbamato de metileno, donde el compuesto de Fármaco-Enlazador tiene la estructura de Fórmula V:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; donde

Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de la Unidad Estiradora (Z) como se define en la reivindicación 1 y está compuesto por un grupo funcional que proporciona la unión covalente de una Unidad de Ligando a la Unidad Estiradora (Z); y

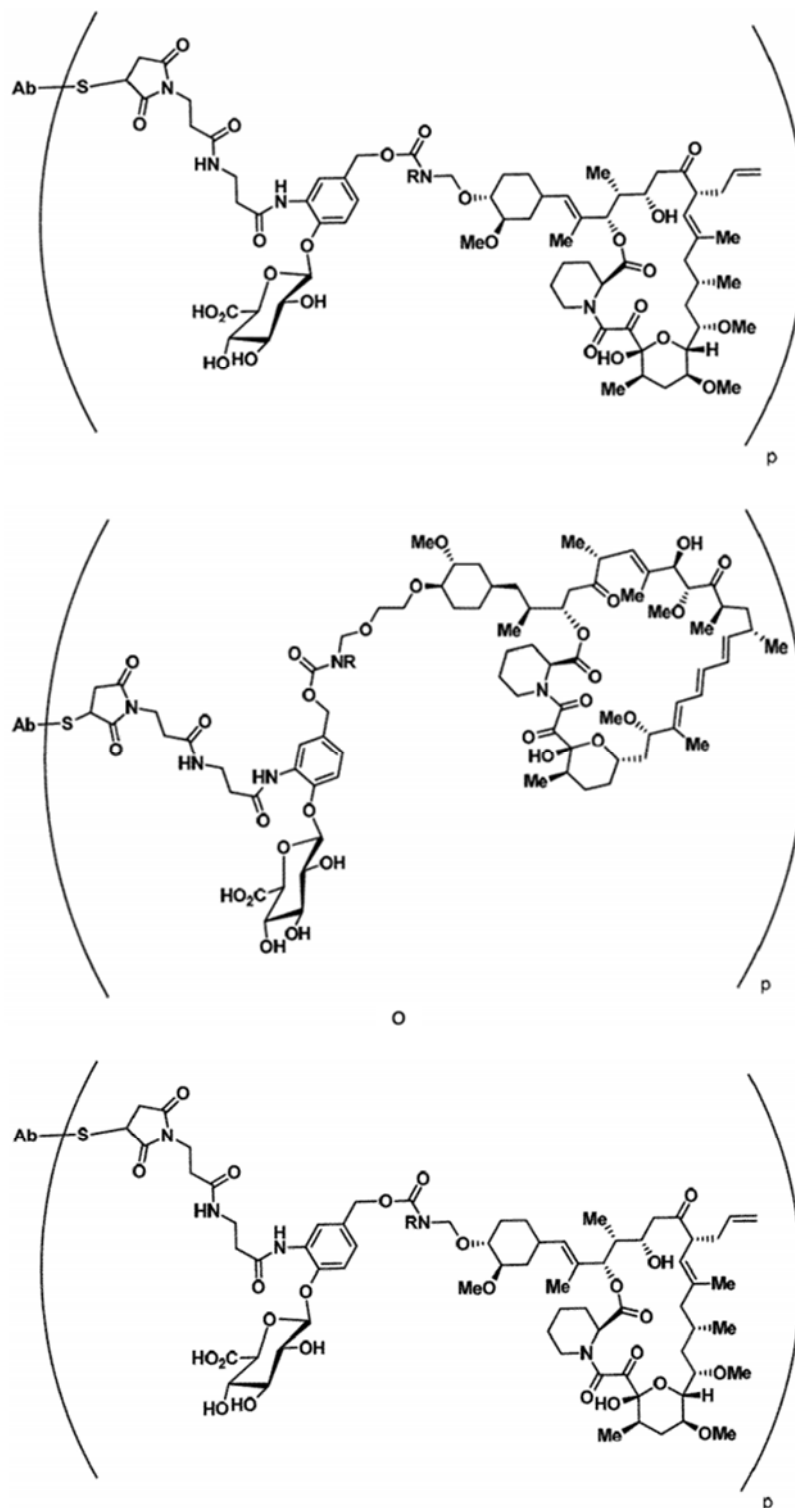
B, A, D, T*, X, R, R¹, R² y t son como se definen en la reivindicación 1.

10. Una composición de conjugado de ligando-fármaco que comprende una pluralidad de compuestos conjugados, cada uno de los cuales tiene la estructura de Fórmula (II) en la que el subíndice p es un número entero que oscila entre 1 a 8, en donde los grupos de variables restantes son como se definen para cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. El compuesto conjugado de fármaco-ligando de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el compuesto enlazador de fármaco de la reivindicación 9, o la composición de conjugado de fármaco-ligando de la reivindicación 10, donde la unidad de fármaco corresponde en estructura al fármaco que tiene funcionalidad hidroxilo. grupo cuyo heteroátomo de oxígeno es capaz de incorporarse en una unidad de carbamato de metileno; en el que el fármaco es capaz de unirse a FKBP para inhibir mTOR o la función efectora de calcineurina.

12. El compuesto conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 11, en el que el fármaco de unión a FKBP es everolimus, tacrólimus o sirolimus.

13. El compuesto conjugado de ligando-fármaco o la composición de conjugado de ligando-fármaco de la reivindicación 11, en el que el compuesto o composición conjugado de ligando-fármaco tiene la estructura de:



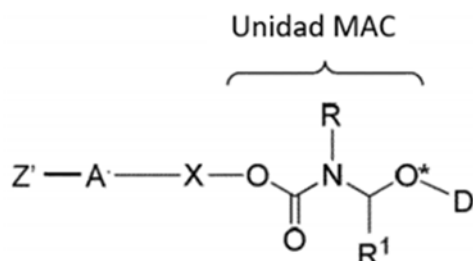
en donde el resto Ab-S- es una Unidad de Ligando de anticuerpo; y el subíndice p varía opcionalmente de 1 a 8.

14. El compuesto conjugado ligando-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el compuesto ligando-enlazador de la reivindicación 9, o la composición de conjugado ligando-fármaco de la reivindicación 10, en la que la Unidad de Fármaco corresponde a un fármaco de auristatina que tiene un grupo funcional hidroxilo, en el que el grupo funcional se ha incorporado a la unidad de carbamato de metileno indicada de Fórmula (II); y en donde el fármaco de auristatina es capaz de unirse a la tubulina para interrumpir la función de la tubulina, en particular, el fármaco de auristatina es MMAE o auristatina T.

15. El compuesto Conjugado de Ligando-Fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de Conjugado de Ligando-Fármaco 11 de la reivindicación 10 para uso en el tratamiento del cáncer.

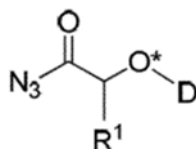
16. El compuesto Conjugado de Ligando-Fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de Conjugado de Ligando-Fármaco de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

17. Un método para preparar un compuesto enlazador de fármaco de la reivindicación 9 que tiene la estructura de



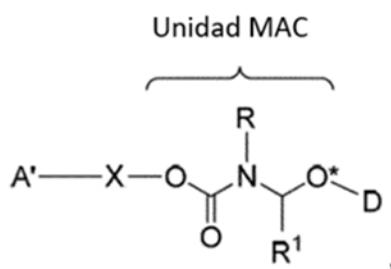
comprendiendo dicho método:

poner en contacto un fármaco libre modificado que tiene la estructura de:



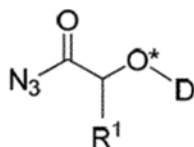
con un resto enlazador intermedio representado por: $\text{Z}' - \text{A}' - \text{X}' - \text{OH}$, en condiciones suficientes para proporcionar la unidad MAC indicada a través de la transposición de Curtius, en el que A, D, X, Z', R y R¹ son como se definen en la reivindicación 9; X' es un precursor de la fracción auto-inmoladora de X y tiene un grupo funcional hidroxilo que participa en la transposición de Curtius.

18. Un método para preparar un intermedio de un compuesto vinculador de fármaco de la reivindicación 9, en el que el intermedio tiene la estructura de



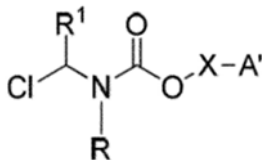
comprendiendo dicho método:

(a) poner en contacto un fármaco libre modificado que tiene la estructura de:



presentado por: $\text{A}' - \text{X} - \text{OH}$, en condiciones suficientes para proporcionar la Unidad MAC indicada a través de la transposición de Curtius, en el que A' es un precursor de la Unidad Conectora de una Unidad Conectora (A) del compuesto de Fármaco-Enlazador y está compuesto por un grupo funcional para la formación de enlaces con el resto del compuesto de Fármaco-Enlazador; A, X, D, R y R¹ son como se definen en la reivindicación 9; o

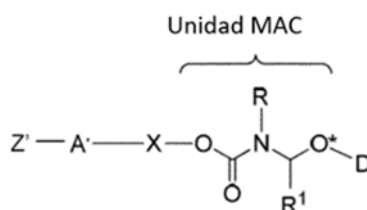
(b) poner en contacto un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo libre con una N-clorometilamina que tiene la estructura de:



en condiciones suficientes para la sustitución del átomo de cloro con el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional fármaco libre,

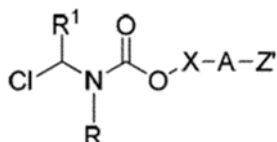
en el que A' es una Unidad Conectora precursor de una Unidad Conectora (A) del compuesto de Fármaco-Enlazador y está compuesto por un grupo funcional para la formación de enlaces con el resto del compuesto de Fármaco-Enlazador; X, R y R¹ se definen como en la reivindicación 9.

19. Un método para preparar un compuesto de Fármaco-Enlazador de la reivindicación 9, en el que el compuesto tiene la estructura de



comprendiendo dicho método:

poner en contacto un fármaco que tiene un grupo funcional hidroxilo libre con una N-clorometilamina que tiene la estructura de:

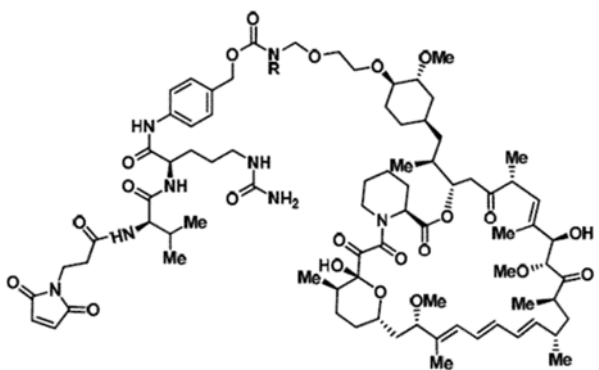


en condiciones suficientes para la sustitución del átomo de cloro con el heteroátomo de oxígeno de dicho grupo funcional de fármaco libre,

en el que Z' es un precursor de la Unidad Estiradora de una Unidad Estiradora (Z) de un Compuesto Conjugado de Fármaco Ligando de Fórmula (II) y comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente entre Z y la Unidad de Ligando dentro del Compuesto Conjugado de Fármaco y Ligando;

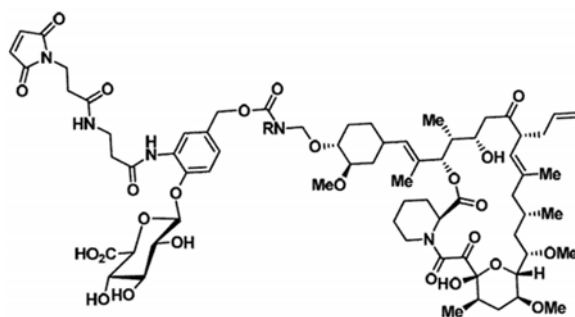
A, X, D, R y R¹ son como se definen en la reivindicación 9.

20. El compuesto vinculador de fármacos de la reivindicación 11, en el que el compuesto tiene la estructura de:



5

10



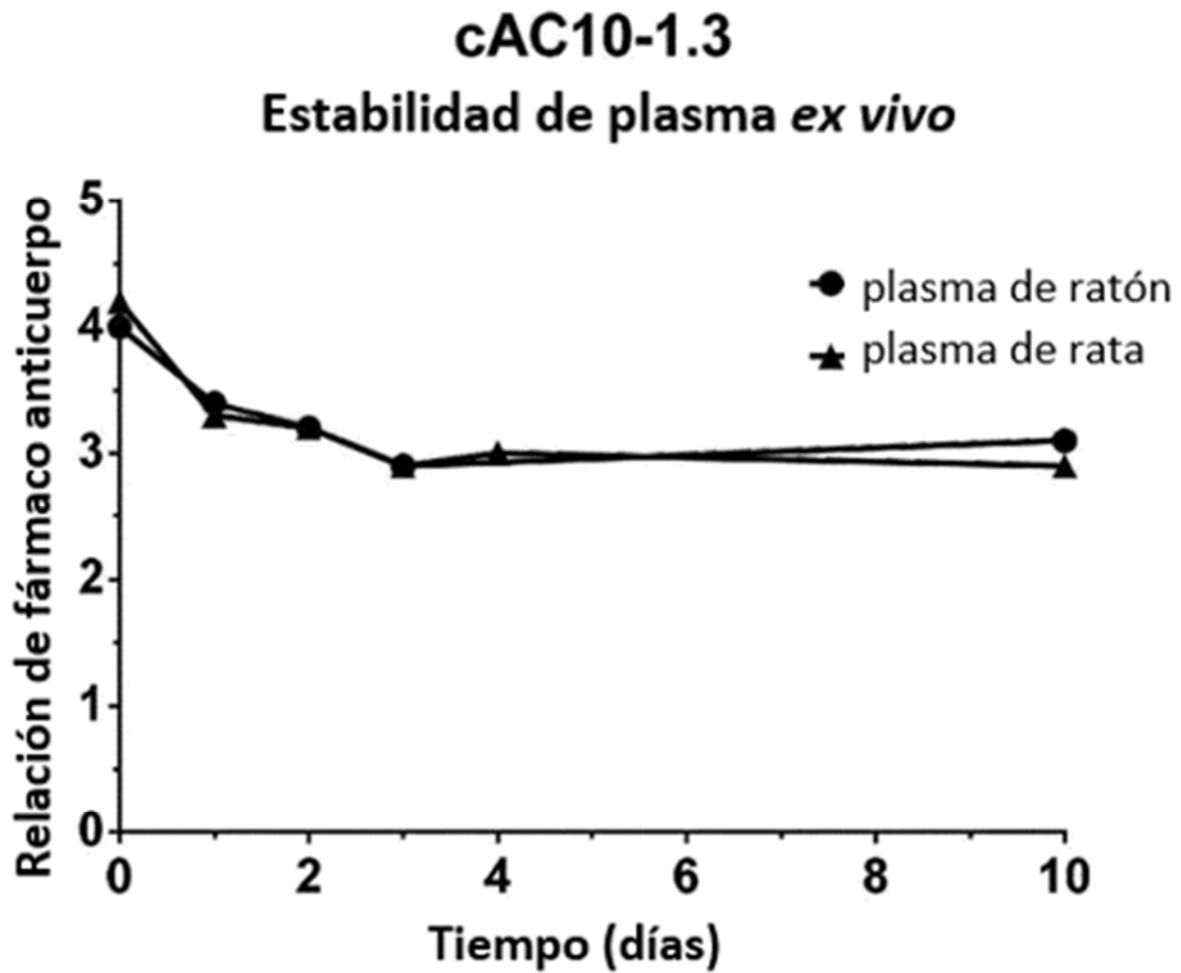
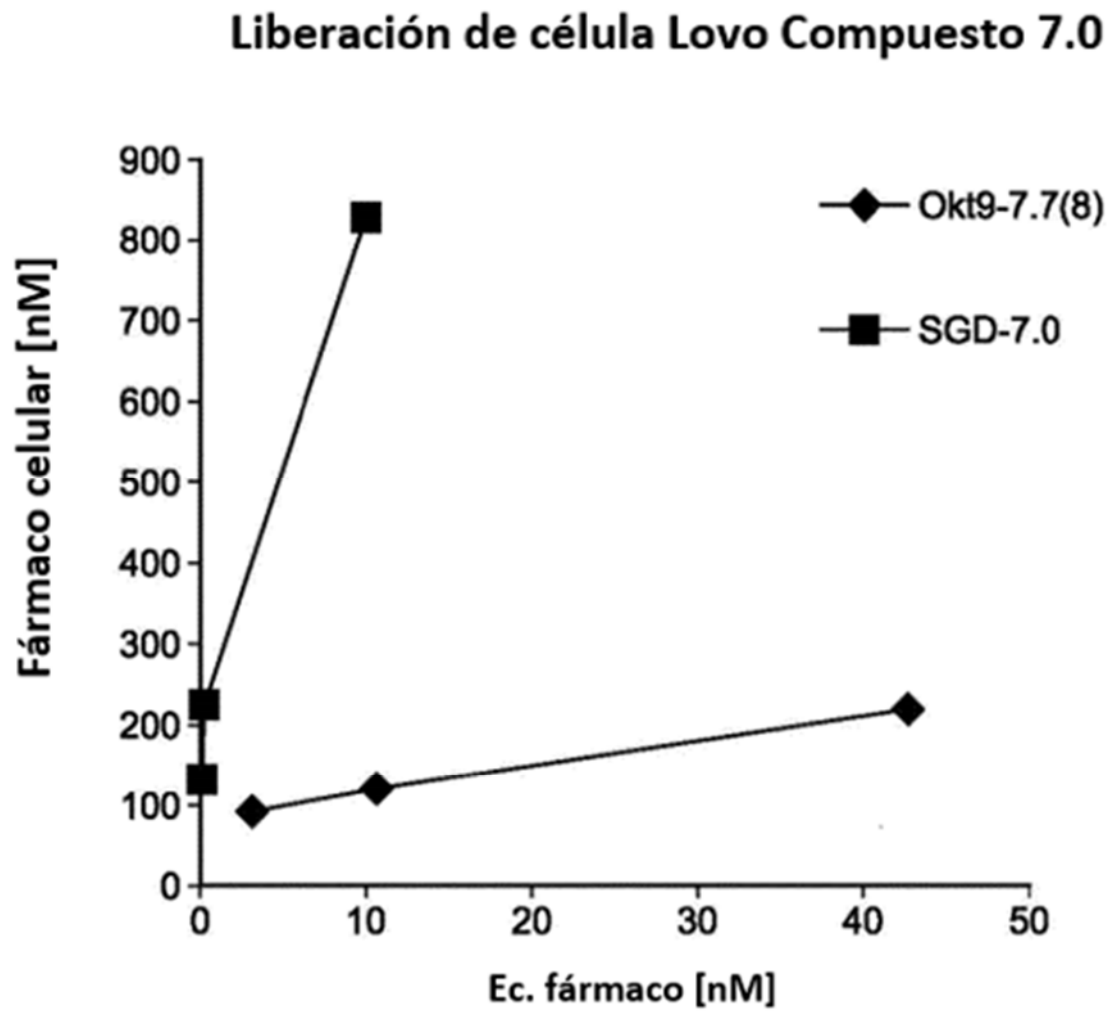


Fig. 1

*Fig. 2*