

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 268**

51 Int. Cl.:

**C07D 491/08** (2006.01)

**A61K 31/4741** (2006.01)

**A61K 31/475** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/US2013/025247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO2013122823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13704871 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2814829**

54 Título: **Compuestos de enediino, conjugados de los mismos y usos y métodos para ello**

30 Prioridad:

**13.02.2012 US 201261598143 P**  
**31.05.2012 US 201261653785 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHOWDARI, NAIDU S.;**  
**GANGWAR, SANJEEV y**  
**SUFI, BILAL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 615 268 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

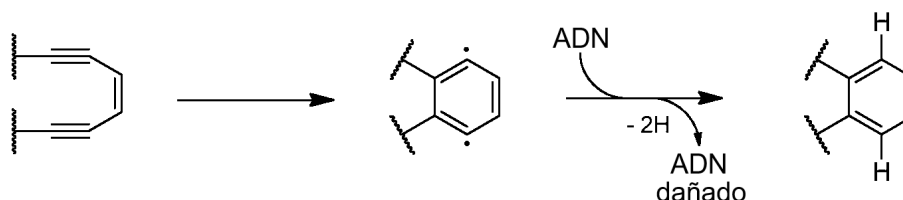
Compuestos de enediino, conjugados de los mismos y usos y métodos para ello

5 **Campo técnico de la invención**

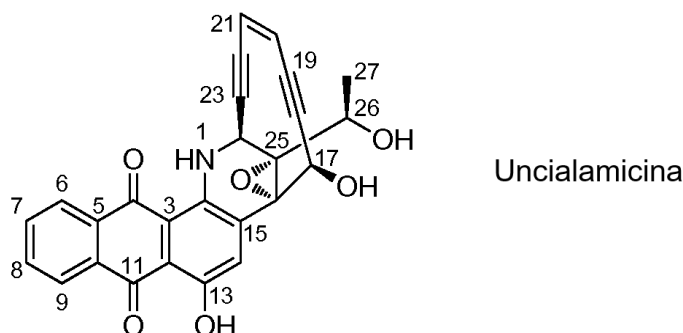
La presente invención se refiere a compuestos de enediino y conjugados de los mismos, métodos para producir y usar tales compuestos y conjugados y composiciones que comprenden tales compuestos y conjugados.

10 **Antecedentes de la invención**

Los enediinos son una familia de antibióticos que tienen un sistema de anillos distintivos tensionados de nueve o diez miembros, que comprende un doble enlace de Z-carbono-carbono y dos triples enlaces carbono-carbono, en general dispuestos de manera que los dos últimos flanquean el primero. Los enediinos son potentes dañadores del ADN, causando cortes de cadenas sencillas y dobles. Su potencia se atribuye a su capacidad de unirse al ADN y experimentar una redistribución de Bergmann, en el cual el sistema de anillos tensionados se convierte en un dirradical de 1,4-bencenoide altamente reactivo, el cual daña el ADN extrayéndole sus hidrógenos.



La uncialamicina es un enediino aislado de la cepa *Streptomyces*, que se encuentra en el líquen *Cladonia uncialis* (Davies et al. 2005; 2007). (Las citas completas de las referencias citadas en la presente memoria descriptiva por el autor o inventor nombrado primero y el año se proporcionan en la sección titulada "REFERENCIAS" más adelante en el presente documento.)



Uncialamicina

La estructura de la uncialamicina se ha confirmado mediante síntesis total (Nicolaou et al. 2007a; 2007b). En el transcurso de la síntesis, se observó que el epímero 26(S) no natural fue casi tan activo como el epímero 26(R) natural - esto es - la estereoquímica del metilo C27 tuvo un efecto menor en la actividad biológica. Ambos epímeros fueron activos contra varias líneas celulares de tumores de ovarios. Los valores  $IC_{50}$  variaron desde  $9 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-10}$ , dependiendo del epímero y la línea o sublínea celular (Nicolaou et al., 2008).

Los conjugados son un método importante para el suministro de fármacos anticancerosos, los cuales a menudo son altamente citotóxicos y de otra manera podrían ser problemáticos para su administración debido al riesgo de toxicidad sistémica. En un conjugado, el fármaco se conjuga (se une covalentemente) con un resto que marca como diana que se une específica o preferentemente a una entidad química característica de la célula cancerosa, suministrando así el fármaco con alta especificidad. Además, el fármaco se mantiene en una forma inactiva hasta que se libera del conjugado, generalmente mediante la escisión del enlazante covalente.

Normalmente, el resto diana es un anticuerpo o una porción del mismo de unión al antígeno, cuyo antígeno se sobreexpresa o se expresa únicamente por una célula cancerosa ("antígeno asociado al tumor"). En tales casos, a veces el conjugado resultante se denomina a veces un "inmunoconjugado" o un "conjugado de anticuerpo-fármaco" (ADC, por sus siglas en inglés). Preferentemente, el antígeno asociado al tumor se ubica en la superficie de la célula cancerosa, pero también puede ser uno que se segrega en el espacio extracelular próximo. Después de la unión, el complejo de antígeno-conjugado se internaliza y finalmente encuentra su trayecto dentro de un cuerpo vesicular, tal como un lisosoma, donde el enlazante covalente se escinde liberando el fármaco activo para que ejerza su efecto quimioterapéutico.

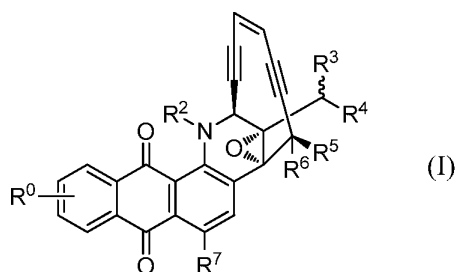
Ventajosamente, el enlazante covalente se diseña de manera que la escisión sea causada por un factor prevalente dentro de una célula cancerosa, pero no en el plasma. Uno de tales factores es el bajo pH lisosómico, de manera que el enlazante covalente pueda ser un grupo sensible a ácido, tal como una hidrazona. Otro factor tal es la

concentración intracelular generalmente alta de glutatión, lo que permite la escisión de un enlazante covalente disulfuro mediante un mecanismo de intercambio de disulfuro. Incluso otro factor tal es la presencia de enzimas lisosómicas, tales como catepsina B, la cual puede escindir los enlazantes peptídicos diseñados para ser sustratos preferidos (Dubowchik et al. 2002).

- 5 Los conjugados se han usado para suministrar fármacos de enediino en oncología. El Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®) es un conjugado de un anticuerpo monoclonal anti-CD33 y un derivado del enediino calicheamicina. Se aprobó para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, pero después se retiró del mercado. Varios otros fármacos de enediino, en especial en la forma conjugada, han sido objeto de esfuerzos para el desarrollo. Para obtener una revisión, véase Shao 2008. El documento WO 93/23046 desvela compuestos de escisión de ADN, citotóxicos y antitumorales que son sistemas de anillo condensado enantiomérico que contienen un anillo macrocíclico de enediino y un anillo epoxi.

**Breve resumen de la invención**

- 15 La presente invención proporciona compuestos a base de un andamiaje de uncialamicina, que son potentes citotoxinas que tienen utilidad como fármacos quimioterapéuticos, usadas bien como tales o en conjugados. En un aspecto, se proporciona un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



20 en la que

- 25 R<sup>0</sup> es NHR<sup>1a</sup>, NHC(=O)OR<sup>1b</sup>, NHC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>NHR<sup>1a</sup>, F, Cl, Br, OR<sup>1a</sup> o SR<sup>1b</sup>;  
 R<sup>1a</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, C(=O)CHR<sup>8</sup>NH<sub>2</sub> o C(=O)R<sup>9</sup>NH<sub>2</sub>;  
 R<sup>1b</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>;



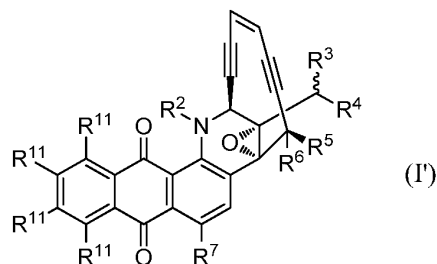
- 30 R<sup>2</sup> es H, R<sup>10</sup>, C(=O)R<sup>10</sup> o C(=O)OR<sup>10</sup>;  
 R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido;  
 R<sup>4</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup>, o NHC(=O)R<sup>10</sup>;  
 R<sup>5</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup>, o NHC(=O)R<sup>10</sup>;  
 35 R<sup>6</sup> es H o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido; o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se combinan para formar =O;  
 R<sup>7</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup>, o NHC(=O)R<sup>10</sup>;  
 R<sup>8</sup> es el resto de la cadena lateral de un α-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina;  
 40 R<sup>9</sup> es arileno sustituido o no sustituido, heteroarileno sustituido o no sustituido, alquilarileno sustituido o no sustituido, cicloalquileo sustituido o no sustituido, o heterocicloalquileo sustituido o no sustituido;  
 cada R<sup>10</sup> es independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido; o heteroarilo sustituido o no sustituido; y  
 n es 2, 3, 4, 5 o 6;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 50 Preferentemente, en la fórmula (I) R<sup>0</sup> es NHR<sup>1a</sup>.

El grupo NHR<sup>1a</sup> puede unirse a cualquiera de los átomos de carbono en las posiciones 6, 7, 8 o 9 (véase la fórmula estructural de uncialamicina, anteriormente, para la numeración de los átomos de carbono). De este modo, la

estructura de fórmula (I) puede representarse de manera equivalente por la fórmula (I')



5 donde uno de los grupos  $R^{11}$  es  $R^0$  y los grupos  $R^{11}$  restantes son cada uno H y  $R^0$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  y  $R^7$  son como se definieron antes para la fórmula (I).

La unciamicina es un candidato potencial para el componente farmacológico en un conjugado, pero carece de grupos funcionales que puedan usarse con facilidad como sitios de conjugación con un resto que marca como diana sin comprometer la actividad biológica. Se ha descubierto que puede introducirse un grupo  $R^0$  en el anillo aromático más a la izquierda en el resto antraquinona, como se muestra en la fórmula (I), sin pérdida inaceptable de actividad biológica y, además, que el grupo  $R^0$  es un sitio de conjugación versátil. Por lo tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) enlazado covalentemente a un resto que marca como diana que se une específica o preferentemente a una entidad química en una célula diana, la cual es preferentemente una célula cancerosa. Preferentemente, el resto que marca como diana es un anticuerpo - más preferentemente un anticuerpo monoclonal y, todavía más preferentemente, un anticuerpo monoclonal humano - y la entidad química es un antígeno asociado al tumor.

En otra realización, se proporciona una composición de materia que comprende un compuesto de la presente invención y un resto enlazante que tiene un grupo funcional reactivo, adecuado para la conjugación con un resto que marca como diana.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto que padece cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto que marca como diana (en particular, un anticuerpo). Las células cancerosas pueden ser células de leucemia, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de próstata.

En otra realización, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que padece tal cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto que marca como diana (en particular, un anticuerpo). En otra realización, se proporciona el uso de un compuesto de la presente invención o un conjugado del mismo con un resto que marca como diana (en particular, un anticuerpo) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto que padece tal cáncer. El cáncer puede ser leucemia, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer pulmonar, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de próstata.

#### Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 a 6 muestran esquemas de reacción de la síntesis de los compuestos de la presente invención. Las Figuras 7 a 10 muestran esquemas de reacción de la unión del enlazante y grupos reactivos funcionales a los compuestos de la presente invención, en la preparación para la conjugación. Las Figuras 11a y 11b muestran gráficas de la actividad antiproliferativa de un compuesto de la presente invención, en comparación con los compuestos de referencia seleccionados. Las Figuras 12a y 12b muestran gráficas de la actividad antiproliferativa de compuestos adicionales de la presente invención, en comparación con los compuestos de referencia seleccionados. Las Figuras 13a, 13b y 13c muestran gráficas de la actividad antiproliferativa de conjugados de anticuerpo-fármaco hechos a partir de los compuestos de la presente invención.

#### Descripción Detallada de la Invención

##### Definiciones

“Anticuerpo” significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, “porción de unión al antígeno”) o variantes de los mismos de cadena sencilla. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera ( $V_L$

o  $V_k$ ) y una región constante de la cadena ligera que comprende un dominio único,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones de armazón (FR) más conservadas. Cada  $V_H$  y  $V_L$  comprende tres CDR y cuatro FR, arregladas desde el extremo terminal amino a carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la unión del anticuerpo a los factores o tejidos hospedadores, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. Se dice que un anticuerpo “se une específicamente” a un antígeno X si el anticuerpo se une al antígeno X con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente,  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferentemente  $6 \times 10^{-9}$  M o menos, más preferentemente  $3 \times 10^{-9}$  M o menos, aún más preferentemente  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada se puede modificar genéticamente para afectar el tipo o el alcance de la glucosilación, extender la vida media del anticuerpo, mejorar o reducir las interacciones con las células efectoras o el sistema de complemento, o modular algunas otras propiedades. La modificación genética se puede realizar mediante el reemplazo, adición o eliminación de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio por otro dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de los anteriores.

“Fragmento de unión al antígeno” y “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo”) significan uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', el cual es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6ª ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un brazo único de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), el cual consiste de un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un dominio variable único y dos dominios constantes. Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que permite producirlos como una cadena proteica única en la cual las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única o scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también se abarcan dentro del término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo.

Un “anticuerpo aislado” significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes del antígeno X). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno X puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de antígeno X de otras especies. En ciertas realizaciones, un anticuerpo aislado se une específicamente al antígeno X humano y no reacciona cruzado con otros antígenos X (no humanos). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o material celular.

“Anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” significa una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única, la cual exhibe una afinidad y especificidad de unión única para un epítipo particular.

“Anticuerpo humano” significa un anticuerpo que tiene regiones variables en las cuales las regiones tanto de armazón como CDR (y la región constante, si está presente) se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones tardías, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas al azar o mutagénesis de sitio específico *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano” no incluye anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas.

“Anticuerpo monoclonal humano” significa un anticuerpo que exhibe una especificidad de unión única, la cual tiene regiones variables en las cuales las regiones tanto de armazón como CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada.

“Alifático” significa un resto hidrocarburo no aromático, saturado o insaturado de cadena lineal o ramificada, que tiene el número especificado de átomos de carbono (por ejemplo, como en “alifático  $C_3$ ”, “alifático  $C_{1-C_5}$ ” o “alifático  $C_1$  a  $C_5$ ”; las últimas dos frases son sinónimos de un resto alifático que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, donde

el número de átomos de carbono no se especifica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos en el caso de restos alifáticos insaturados).

5 “Alquilo” significa un resto alifático saturado, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que es aplicable. A modo ilustrativo, las porciones de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, t-butilo, 1-butilo, 2-butilo, y similares. “Alquilenio” significa una contraparte divalente de un grupo alquilo, tal como CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>.

10 “Alquenilo” significa un resto alifático que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que es aplicable. A modo ilustrativo, las porciones de alquenilo de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), cis-1-propenilo, trans-1-propenilo, E- (o Z-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.

15 “Alquinilo” significa un resto alifático que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono, con la misma convención para designar el número de átomos de carbono que es aplicable. A modo ilustrativo, los grupos alquinilo de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.

20 “Cicloalifático” significa un resto hidrocarburo no aromático saturado o insaturado que tiene de 1 a 3 anillos, cada anillo tiene de 3 a 8 (preferentemente, de 3 a 6) átomos de carbono. “Cicloalquilo” significa un resto cicloalifático en el que cada anillo está saturado. “Cicloalquenilo” significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. “Cicloalquinilo” significa un resto cicloalifático en el que al menos un anillo tiene al menos un enlace triple de carbono-carbono. A modo ilustrativo, las porciones cicloalifáticas incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Las porciones cicloalifáticas preferidas son cicloalquilo, en especial ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo. “Cicloalquilenio” significa una contraparte divalente de un grupo cicloalquilo.

30 “Heterocicloalifático” significa un resto cicloalifático en el que, en al menos un anillo del mismo, se han reemplazado hasta tres (preferentemente 1 a 2) carbonos por un heteroátomo seleccionado independientemente de N, O o S, donde N y S pueden oxidarse opcionalmente, y N puede cuaternizarse opcionalmente. De modo similar, “heterocicloalquilo”, “heterocicloalquenilo” y “heterocicloalquinilo” significan un resto cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en el cual se ha modificado al menos un anillo del mismo. Los restos heterocicloalifáticos a modo de ejemplo incluyen aziridinilo, azetidino, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropirranilo, tetrahidrotiopianilo, tetrahidrotiopianilsulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiomorfolinil sulfóxido, tiomorfolinil sulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo y similares. “Heterocicloalquilenio” significa una contraparte divalente de un grupo heterocicloalquilo.

35 “Alcoxi”, “ariloxi”, “alquiltio” y “ariltio” significan -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Los ejemplos son metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.

40 “Halógeno” o “halo” significan fluoro, cloro, bromo o yodo.

45 “Arilo” significa un resto hidrocarburo que tiene un sistema de anillos mono-, bi- o tricíclicos, en el que cada anillo tiene desde 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos en el sistema de anillos se pueden fusionar entre sí (como en naftilo) o unir entre sí (como en bifenilo) y se pueden fusionar o unir a anillos no aromáticos (como en indanilo o ciclohexilfenilo). A modo ilustrativo, los restos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antraceno y acenaftilo. “Arieno” significa una contraparte divalente de un grupo arilo, por ejemplo 1,2-fenileno, 1,3-fenileno o 1,4-fenileno.

50 “Heteroarilo” significa un resto que tiene un sistema de anillos mono-, bi- o tricíclicos, en el que cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono, y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O o S, donde N y S pueden oxidarse opcionalmente, y N puede cuaternizarse opcionalmente. Al menos un anillo aromático que contiene un heteroátomo puede fusionarse a otros tipos de anillos (como en benzofuranilo o tetrahidroisoquinolilo) o se puede unir directamente a otros tipos de anillos (como en fenilpiridilo o 2-ciclopentilpiridilo). A modo ilustrativo, las porciones de heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares. “Heteroarileno” significa una contraparte divalente de un grupo arilo.

60 Cuando se indica que un resto puede sustituirse, por ejemplo, usando las frases “sustituido o no sustituido” u “opcionalmente sustituido” como en “alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> sustituido o no sustituido” o “heteroarilo opcionalmente sustituido”, tal porción puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, preferentemente uno a cinco, más preferentemente uno o dos. Los sustituyentes y patrones de sustitución se pueden seleccionar por uno de experiencia normal en la técnica, teniendo en cuenta la porción a la cual se une el sustituyente, para proporcionar compuestos que son químicamente estables y que se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas en la técnica

así como los métodos descritos en la presente.

5 “Aralalquilo”, “(heterocicloalifático)alquilo”, “aralalquenilo”, “aralalquinilo”, “biaralalquilo” y similares significan una porción de alquilo, alquenilo o alquinilo, según el caso, sustituida con un resto arilo, heterocicloalifática, biarilo, etc., según el caso, con la valencia abierta (no satisfecha) en el resto alquilo, alquenilo o alquinilo, por ejemplo, como en bencilo, fenetilo, N-imidazoiletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, “alquilarilo”, “alquenilicicloalquilo” y similares significan un resto arilo, cicloalquilo, etc., según el caso, sustituido con un resto alquilo, alquenilo, etc., según el caso, por ejemplo, como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. “Hidroxi-alquilo”, “haloalquilo”, “alquilarilo”, “cianoarilo” y similares significan un resto alquilo, arilo, etc., según el caso, sustituido con uno o más de los sustituyentes identificados (hidroxilo, halo, etc., según el caso).

15 A modo ilustrativo, los sustituyentes aceptables incluyen, pero no se limitan a, alquilo (en especial, metilo o etilo), alquenilo (en especial, alilo), alquinilo, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo (en especial, fluoro), haloalquilo (en especial, trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (en especial, hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo) (en especial, -OCF<sub>3</sub>), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo), -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>, y similares.

25 Cuando el resto que se sustituye es un resto alifático, los sustituyentes preferidos son arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes más preferidos son halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. En especial se prefieren fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>alquioxio, O(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>alquilen)OH y O(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>alquilen)halo.

40 Cuando el resto que se sustituye es un resto cicloalifático, heterocicloalifático, arilo o heteroarilo, los sustituyentes preferidos son alquilo, alquenilo, alquinilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes más preferidos son alquilo, alquenilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub> y -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>. En especial se prefieren alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, ciano, nitro, halo y alcoxi de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

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

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

65 Aquellos expertos en la materia comprenderán que los compuestos pueden tener formas tautoméricas (por ejemplo, formas ceto y enol), formas de resonancia y formas zwitteriónicas que son equivalentes a las representadas en las fórmulas estructurales usadas en el presente documento, y que las fórmulas estructurales abarcan tales formas

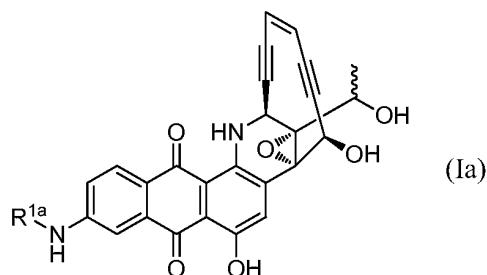
tautoméricas, de resonancia o zwitteriónicas.

“Éster farmacéuticamente aceptable” significa una éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto de origen o una sal del mismo, o tiene por sí mismo actividad similar a la del compuesto de origen. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, en especial, metilo, etilo o n-propilo.

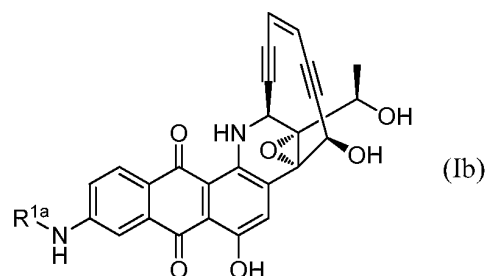
“Sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal de un compuesto adecuado para la formulación farmacéutica. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición de ácido, tal como sulfato, bromhidrato, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato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

#### COMPOSICIONES

Una realización preferida de acuerdo con la fórmula (I) es un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (Ia) o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. En esta realización, un grupo NHR<sup>1a</sup> se une a C6, en donde R<sup>1a</sup> es como se definió anteriormente en el contexto de la fórmula (I):

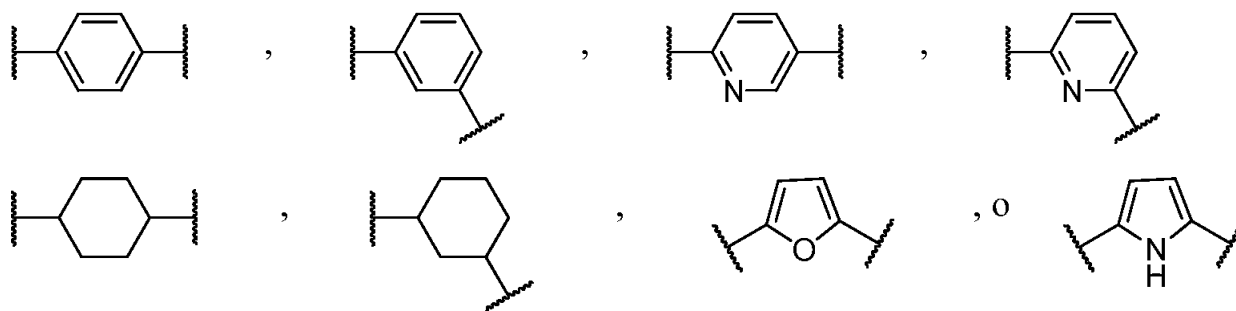


Una realización más preferida es un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (Ib), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R<sup>1a</sup> es como se definió anteriormente en el contexto de la fórmula (I). En la fórmula (Ib), la estereoquímica de C27-metilo corresponde a la de la uncialamicina de origen natural (véase la fórmula estructural de uncialamicina, anteriormente).

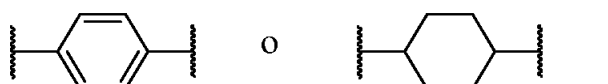


En cada uno de R<sup>0</sup>, R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup>, cuando se presentan en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en la presente memoria descriptiva, cuando un grupo alquilo, alquilenilo, arilo, arilenilo, heteroarilo, heteroarilenilo, cicloalquilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilo o heterocicloalquilenilo se indica siendo bien sustituido o no sustituido, se prefiere la realización no sustituida. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>2</sup> es preferentemente H o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, más preferentemente, H. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en la presente solicitud, R<sup>3</sup> es preferentemente alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, más preferentemente, Me. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>4</sup> es preferentemente OH, OR<sup>10</sup>, u OC(=O)R<sup>10</sup> (con R<sup>10</sup> siendo preferentemente alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), más preferentemente, OH. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>5</sup> es preferentemente OH, OR<sup>10</sup>, u OC(=O)R<sup>10</sup> (con R<sup>10</sup> siendo preferentemente alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), más preferentemente, OH. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>6</sup> es preferentemente H. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>7</sup> es preferentemente OH, OR<sup>10</sup>, u OC(=O)R<sup>10</sup> (con R<sup>10</sup> siendo preferentemente alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), más preferentemente, OH. Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>9</sup> es preferentemente





5 Más preferentemente, R<sup>9</sup> es

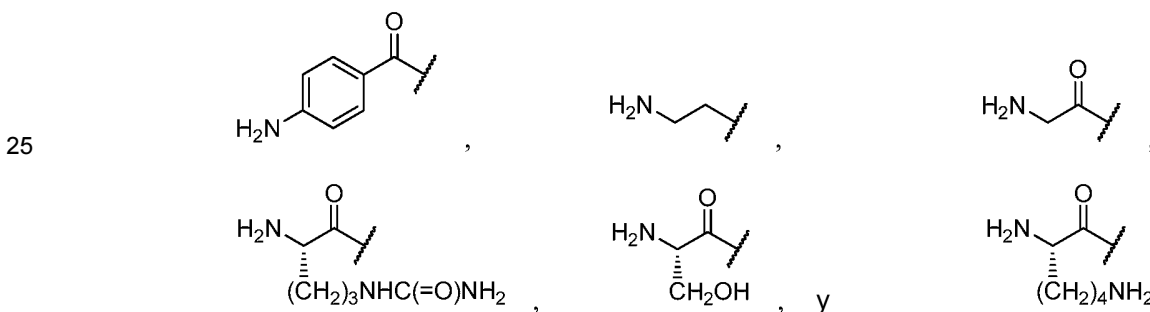


especialmente, el primero.

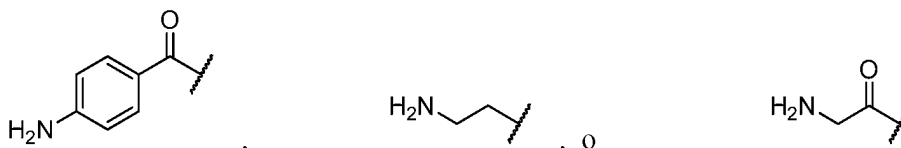
10 Cuando se presenta en la fórmula (I) o en otras fórmulas en otra parte en la presente memoria descriptiva, R<sup>10</sup> es preferentemente alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ciclohexilo, ciclopentilo, fenilo, furanilo o piridilo. Más preferentemente, R<sup>10</sup> es metilo, etilo, propilo o isopropilo.

15 Cuando se presenta en la fórmulas (I), (Ia), (Ib) o en otras fórmulas en otra parte en esta descripción, R<sup>8</sup> es preferentemente el resto de la cadena lateral de un α-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en arginina, ácido aspártico, citrulina, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Más preferentemente, R<sup>8</sup> es el resto de la cadena lateral de glicina, lisina, citrulina o serina. Preferentemente, la estereoquímica en el carbono quiral corresponde a la de un α-aminoácido proteogénico de  
20 origen natural, es decir el isómero L.

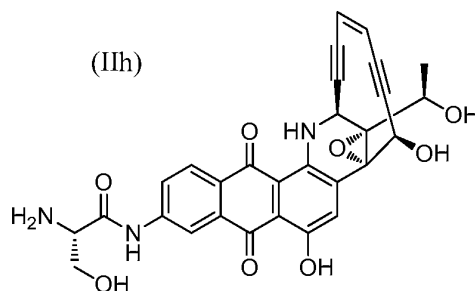
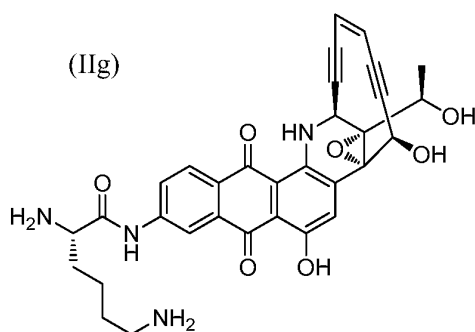
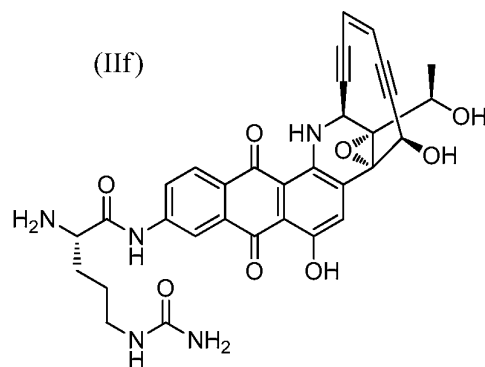
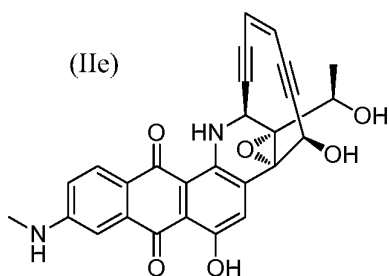
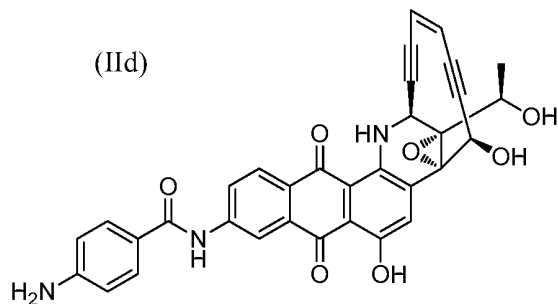
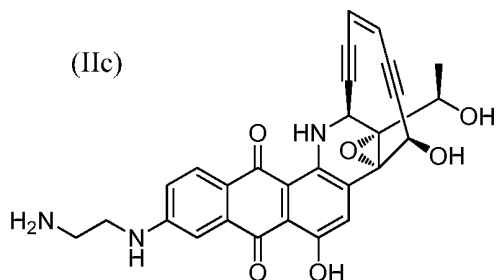
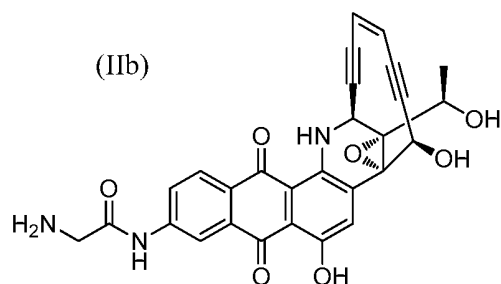
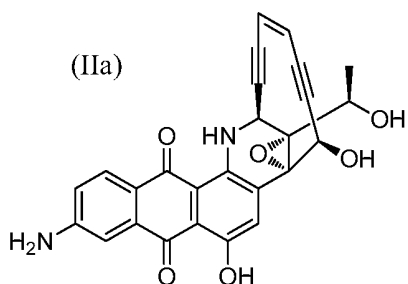
En una realización preferida de los compuestos que tienen estructuras de acuerdo con las fórmulas (I), (Ia) y/o (Ib), el grupo R<sup>1a</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me,



30 En una realización más preferida de los compuestos que tienen estructuras de acuerdo con las fórmulas (I), (Ia) y/o (Ib), el grupo R<sup>1a</sup> es H,



35 Los compuestos específicos de la presente invención incluyen los que tienen estructuras de acuerdo con las fórmulas (IIa) a (IIh), o sus sales farmacéuticamente aceptables:



CONJUGADOS

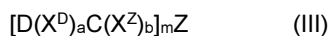
10

Otra realización de la presente invención comprende un compuesto que tiene una estructura representada por las fórmulas (I), (Ia), (Ib), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIg) o (IIh) que se conjuga con un resto que marca como diana que se une específica o preferentemente a una entidad química en una célula cancerosa. Preferentemente, el resto que marca como diana es un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno, y la entidad química es un antígeno asociado al tumor. Preferentemente, la conjugación se realiza mediante un enlace químico al grupo R<sup>0</sup>.

15

En otra realización, se proporciona un conjugado que comprende un compuesto citotóxico de acuerdo con la presente invención y un ligando, representado por la fórmula (III)

20



donde Z es un ligando; D es un compuesto citotóxico de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un compuesto de acuerdo con las fórmulas (I), (Ia) o (Ib)); y  $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$  se denominan colectivamente un "resto enlazante" o "enlazante" porque enlazan Z y D. Dentro del enlazante, C es un grupo escindible designado para

escindirse en o cerca del sitio de acción biológica prevista del compuesto D;  $X^D$  y  $X^Z$  se denominan como porciones espaciadoras (o "espaciadores") porque separan D de C y C de Z, respectivamente; los subíndices a y b son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de  $X^D$  y/o  $X^Z$  es opcional); y el subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente 1, 2, 3 o 4). D,  $X^D$ , C,  $X^Z$  y Z se describen más completamente a continuación.

5 El ligando Z - por ejemplo un anticuerpo - cumple una función de marcaje de diana. Al unirse a un tejido o una célula diana donde se ubica su antígeno o receptor, el ligando Z dirige el conjugado hacia allí. Preferentemente, el tejido o célula diana es un tejido o célula cancerosa, y el antígeno o receptor es un antígeno asociado al tumor, es decir, un antígeno que se expresa únicamente por células cancerosas o se sobreexpresa por células cancerosas, en comparación con las células no cancerosas. La escisión del grupo C en el tejido o célula diana libera el compuesto D para que ejerza su efecto citotóxico localmente. En algunos casos, el conjugado se internaliza en una célula diana mediante endocitosis, y la escisión toma lugar en la célula diana. De esta manera, el suministro preciso del compuesto D se logra en el sitio de acción previsto, lo cual reduce la dosificación necesaria. Además, el compuesto D normalmente es biológicamente inactivo (o significativamente menos activo) en su estado conjugado, por lo que se reduce la toxicidad no deseada contra los tejidos o células no diana. Debido a que los fármacos anticancerosos son a menudo altamente tóxicos para las células en general, esto es una consideración importante.

20 Como se refleja por el subíndice m, cada molécula del ligando Z puede conjugarse con más de un compuesto D, dependiendo del número de sitios que el ligando Z tiene disponible para la conjugación y las condiciones experimentales empleadas. Los expertos en la técnica comprenderán que, si bien cada molécula individual del ligando Z se conjuga con un número entero de compuestos D, puede analizarse una preparación del conjugado para una relación no de enteros de los compuestos D a ligando Z, para reflejar así un promedio estadístico.

#### *Ligando Z y conjugación del mismo*

25 Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo. Por razones de conveniencia y brevedad, pero no limitantes, la siguiente descripción detallada en la presente sobre la conjugación del ligando Z se escribe en el contexto de que es un anticuerpo, pero los expertos en la materia comprenderán que se pueden conjugar otros tipos de ligando Z, cambiando lo que haya que cambiar. Por ejemplo, los conjugados con ácido fólico como el ligando se pueden dirigir a las células que tienen el receptor de folato en sus superficies (Vlahov et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18(16), 4558-4561; Leamon et al., Cancer Res. 2008, 68 (23), 9839-9844). Por la misma razón, la descripción detallada a continuación se escribe en términos de una relación 1:1 de anticuerpo Z a compuesto D.

35 Preferentemente, el ligando Z es un anticuerpo contra un antígeno asociado al tumor, lo cual permite que un conjugado que comprende tal ligando Z se dirija selectivamente a las células cancerosas. Los ejemplos de tales antígenos incluyen mesotelina, antígeno de membrana prostático específico (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, CD200 (también conocido como OX-2), B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina quinasa 7 (PTK7), RG1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. Preferentemente, el anticuerpo es monoclonal, en especial, un anticuerpo monoclonal humano. La preparación de los anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos antes mencionados se describe en Korman et al., US 2009/0074660 A1 (B7H4); Rao-Naik et al., US 2009/0142349 A1 A2 (CD19); King et al., US 2010/0143368 A1 (CD22); Keler et al., US 7.387.776 B2 (2008) (CD30); Terrett et al., US 2009/0028872 A1 (CD70); Gorczynski et al., US 7,238,352 B2 (2007) (CD200); Korman et al., US 6,984,720 B1 (2006) (CTLA-4); Korman et al., US 8,008,449 B2 (2011) (PD-1); Huang et al., US 2008/0279868 A1 (PSMA); Terrett et al., US 2010/0034826 A1 (PTK7); Harkins et al., US 7,335,748 B2 (2008) (RG1); Terrett et al., WO 2009/045957 A1 (mesotelina); y Xu et al., US 2010/0092484 A1 (CD44); cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

50 El ligando Z también puede ser un fragmento de anticuerpo o mimético de anticuerpo, tal como un aficuerpo, anticuerpo de dominio (dAb), nanocuerpo, unicuerpo, DARPin, anticalina, versacuerpo, duocalina, lipocalina o avimer.

55 Cualquiera de los varios grupos reactivos diferentes en el ligando Z puede ser un sitio de conjugación, incluyendo grupos  $\epsilon$ -amino en los residuos de lisina, restos de carbohidrato colgantes, grupos de ácidos carboxílicos, grupos disulfuro y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa una compensación, lo cual tiene algunas ventajas y algunas desventajas. Para revisiones sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para la conjugación, véase, por ejemplo, Garnett, Adv. Drug Delivery Rev. 53 (2001), 171-216 y Dubowchik and Walquer, Pharmacology & Therapeutics 83 (1999), 67-123, cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

60 En una realización, el ligando Z se conjuga mediante un grupo  $\epsilon$ -amino de lisina. La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples grupos  $\epsilon$ -amino de lisina expuestos, que pueden conjugarse mediante enlaces de amida, urea, tiourea o carbamato usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo una modificación con un agente heterobifuncional (como se describe adicionalmente a continuación). Sin embargo, es difícil controlar qué y cuántos grupos  $\epsilon$ -amino reaccionan, conduciendo a una potencial variabilidad de lote a lote en las preparaciones de conjugados. Además, la conjugación puede causar la neutralización de un grupo  $\epsilon$ -amino protonado importante para conservar la conformación natural del anticuerpo o puede tomar lugar en una lisina cerca o en el sitio de unión al

antígeno, ninguno de estos casos es deseable.

En otra realización, el ligando Z puede conjugarse mediante una cadena lateral de carbohidratos, ya que varios anticuerpos están glucosilados. La cadena lateral de carbohidrato se puede oxidar con peryodato para generar grupos aldehídos los cuales a su vez pueden reaccionar con amins para formar un grupo imina, tal como en semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina se puede convertir en un grupo amina más estable mediante la reducción con cianoborohidruro de sodio. Para descripciones adicionales sobre la conjugación mediante cadenas laterales de carbohidratos, véase, por ejemplo, Rodwell et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83, 2632-2636 (1986); cuya descripción se incorpora en la presente como referencia. Como sucede con los grupos ε-amino de lisina, hay preocupaciones sobre la reproducibilidad de la ubicación del sitio o sitios de conjugación y la estequiometría.

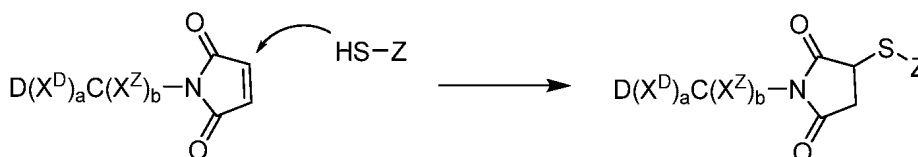
En aún otra realización, el ligando Z puede conjugarse mediante un grupo de ácido carboxílico. En una realización, un grupo de ácido carboxílico terminal se funcionaliza para generar una carbohidrazida, la cual luego se hace reaccionar con una porción de conjugación que porta aldehído. Véase Fisch et al., Bioconjugate Chemistry 1992, 3, 147-153.

En aún otra realización, el anticuerpo Z puede conjugarse mediante un grupo disulfuro que puentea un residuo de cisteína en el anticuerpo Z y un azufre en la otra porción del conjugado. Algunos anticuerpos carecen de grupos tiol (sulfhidrilo) libres, pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo en la región bisagra. En ese caso, los grupos tiol libres se puede generar mediante la reducción de grupos disulfuro naturales. Los grupos tiol generados de esta manera luego se pueden usar para la conjugación. Véase, por ejemplo, Packard et al., Biochemistry 1986, 25, 3548-3552; King et al., Cancer Res. 54, 6176-6185 (1994); y Doronina et al., Nature Biotechnol. 21(7), 778-784 (2003); cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia. Nuevamente, hay preocupaciones con respecto a la ubicación del sitio de conjugación y la estequiometría, y la posible alteración de la conformación natural del anticuerpo.

Se conoce una serie de métodos para introducir los grupos tiol libres en los anticuerpos sin romper los enlaces de disulfuro naturales; los métodos se pueden poner en práctica con un ligando Z de la presente invención. Dependiendo del método empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfhidrilos libres en las ubicaciones predeterminadas. En un procedimiento, se preparan anticuerpos mutados, en los cuales una cisteína se sustituye con otro aminoácido. Véase, por ejemplo, Eigenbrot et al., US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti et al., Bioconjugate Chem. 1994, 5, 504-507; Urnovitz et al., US 4.698.420 (1987); Stimmel et al., J. Biol. Chem., 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam et al., US 7.311.902 B2 (2007); Kuan et al., J. Biol. Chem., 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon et al., J. Biol. Chem., 270 (15), 8571-8577 (1995). En otro procedimiento, se añade una cisteína adicional al extremo terminal C. Véase, por ejemplo, Cumber et al., J. Immunol., 149, 120-126 (1992); King et al., Cancer Res., 54, 6176-6185 (1994); Li et al., Bioconjugate Chem., 13, 985-995 (2002); Yang et al., Protein Engineering, 16, 761-770 (2003); y Olafson et al., Protein Engineering Design & Selection, 17, 21-27 (2004). Un método preferido para introducir cisteínas libres es el que se explica en Liu et al., WO 2009/026274 A1, en el cual se añade una secuencia de aminoácidos que porta una cisteína al extremo terminal C de la cadena pesada de un anticuerpo. Este método introduce un número conocido de residuos de cisteína (uno por cadena pesada) en una ubicación conocida lejos del sitio de unión al antígeno. Las descripciones de los documentos citados en este párrafo se incorporan en el presente documento como referencia.

En todavía otra realización, los grupos ε-amino de lisina pueden modificarse con reactivos heterobifuncionales, tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) - que convierte un grupo ε-amino en un grupo tiol o disulfuro - creando un sustituto de cisteína, por así decirlo. Sin embargo, este método sufre de las mismas limitaciones de ubicación de la conjugación y la estequiometría asociadas con los grupos ε-amino apropiados.

En todavía otra realización preferida, el ligando Z se conjuga mediante el producto de adición nucleofílico de un grupo tiol a un resto aceptor. Un resto aceptor preferido es un grupo maleimida, cuya reacción con un grupo tiol de anticuerpo se ilustra genéricamente a continuación. El grupo tiol puede ser uno nativo o uno introducido como se describió anteriormente.



El ligando Z también puede conjugarse mediante un grupo funcional adaptado para el uso con la química "clic", como se analiza a continuación en el presente documento.

Enlazante  $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$

Como se indicó anteriormente, la porción enlazante de un conjugado de la presente invención comprende hasta 3 elementos: un grupo escindible C y espaciadores opcionales X<sup>Z</sup> y X<sup>D</sup>.

5 El grupo escindible C es un grupo escindible en condiciones fisiológicas, preferentemente seleccionado de tal manera que sea relativamente estable cuando el conjugado se encuentra en circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinde rápidamente una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción previsto, es decir, cerca, en o dentro de la célula diana. Preferentemente, el conjugado se internaliza mediante endocitosis por una célula diana en la unión del anticuerpo Z a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana. Subsecuentemente, la escisión del grupo C ocurre en un cuerpo vesicular de la célula diana (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

15 En una realización, el grupo C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo está ligeramente por encima del neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, alrededor de 5. Por lo tanto, un grupo C cuya escisión se cataliza por ácido se escindiría a una velocidad varios órdenes de magnitud más rápida en un lisosoma que en el plasma sanguíneo. Los ejemplos de grupos sensibles a ácido incluyen cis-aconitil amidas e hidrazonas, como se describe en Shen et al., US 4.631.190 (1986); Shen et al., US 5.144.011 (1992); Shen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 1048-1054 (1981), y Yang et al., Proc. Natl Acad. Sci (USA), 85, 1189-1193 (1988); cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

20 En otra realización, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros pueden escindirse mediante un mecanismo de intercambio de tiol-disulfuro, a una velocidad que depende de la concentración de tiol en el ambiente. Dado que la concentración intracelular del glutatión y otros tioles es mayor que sus concentraciones en suero, la velocidad de escisión de un disulfuro será mayor a nivel intracelular. Además, la velocidad del intercambio de tiol-disulfuro se puede modular ajustando las características estéricas y electrónicas del disulfuro (por ejemplo, un disulfuro de alquilo-arilo contra un disulfuro de alquilo-alquilo; sustitución en el anillo de arilo, etc.), lo que permite el diseño de enlaces de disulfuro que tienen estabilidad en suero mejorada o una velocidad de escisión particular. Para descripciones adicionales relacionadas con los grupos de escisión de disulfuro en conjugados, véase, por ejemplo, Thorpe et al., Cancer Res. 48, 6396-6403 (1988); Santi et al., US 7.541.530 B2 (2009); Ng et al., US 6.989.452 B2 (2006); Ng et al., WO 2002/096910 A1; Boyd et al., US 7.691.962 B2 y Sufi et al., US 2010/0145036 A1; cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

35 Un grupo C preferido comprende un enlace peptídico que se escinde, preferentemente por una proteasa en el sitio de acción previsto, en contraposición a una proteasa en el suero. Normalmente, el grupo C comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente desde 1 a 6 aminoácidos, más preferentemente desde 1 a 3 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser  $\alpha$ -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como los aminoácidos derivados de los mismos, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. El término aminoácido también incluye aminoácidos análogos y miméticos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general H<sub>2</sub>N(R)CHCO<sub>2</sub>H de un aminoácido natural, excepto que el grupo R no es uno encontrado en los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metionina metil sulfonio. Un aminoácido mimético es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un  $\alpha$ -aminoácido, pero funciona de manera similar a aquel. El término "aminoácido no natural" está destinado a representar la forma estereoquímica "D", los aminoácidos naturales son de la forma "L".

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

50 Para los conjugados que no tienen como fin ser internalizados por una célula, se puede elegir un grupo C de forma tal que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular en las cercanías del tejido diana, por ejemplo, una proteasa liberada cerca de células moribundas o una proteasa asociada al tumor. Las proteasas extracelulares asociadas al tumor a modo de ejemplo son las metaloproteasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), thimet oligopeptidasa (TOP, por sus siglas en inglés) y CD10.

60 Para conjugados que se diseñan para internalizarse por una célula, el grupo C preferentemente comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosómica o lisosómica, en especial, la última. Los ejemplos no limitativos de tales proteasas incluyen catepsinas B, C, D, H, L y S, en especial, catepsina B. La catepsina B escinde preferentemente péptidos en una secuencia -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- donde AA<sup>1</sup> es un aminoácido de unión básico o fuertemente ácido (tal como lisina, arginina o citrulina), y AA<sup>2</sup> es un aminoácido hidrofóbico (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina), por ejemplo, Val-Cit (en donde Cit significa citrulina) o Val-Lys. (En la presente, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N a C, como en H<sub>2</sub>N-AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>-CO<sub>2</sub>H, a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Para información adicional con respecto a los grupos escindibles por catepsina, véase Dubowchik et al., Biorg. Med. Chem. Lett. 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik et al.,

Bioorg. Med. Chem. Lett., 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik et al., Bioconjugate Chem. 13, 855-869 (2002); cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia. Otra enzima que se puede utilizar para la escisión de enlaces de peptidilo es legumaina, una cisteína proteasa lisosómica que se escinde preferentemente en Ala-Ala-Asn.

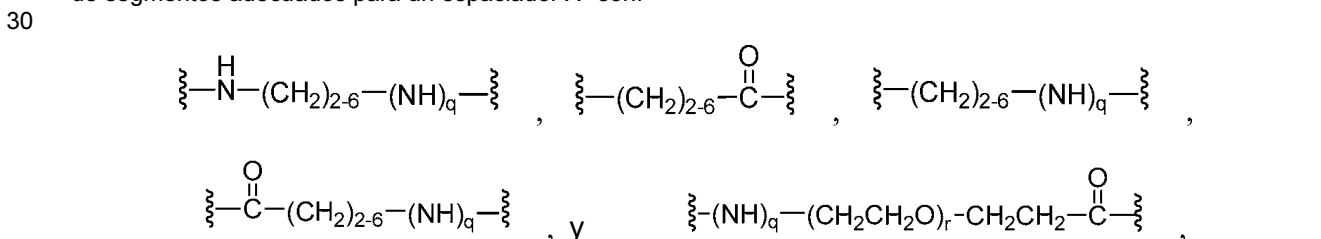
5 En una realización, el grupo C es un péptido que comprende la secuencia de dos aminoácidos -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- en el que AA<sup>1</sup> es lisina, arginina o citrulina, y AA<sup>2</sup> es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra realización, C consiste de una secuencia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

10 La preparación y diseño de grupos C escindibles que consisten de un aminoácido único se describen en Chen et al., US 2010/0113476 A1, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia.

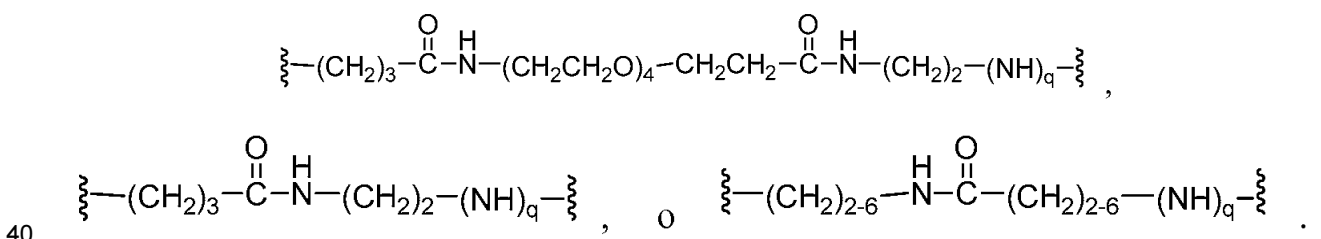
15 El grupo C también puede ser un fotoescindible, por ejemplo, un éter de nitrobenzilo que se escinde en la exposición a la luz.

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

25 Cuando está presente, el espaciador X<sup>Z</sup> proporciona una separación espacial entre el grupo C y el anticuerpo Z, para que el primero interfiera estéricamente con la unión al antígeno por el último o el último interfiera estéricamente con la escisión del primero. Además, el espaciador X<sup>Z</sup> se puede usar para conferir solubilidad aumentada o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X<sup>Z</sup> puede comprender uno o más segmentos modulares, los cuales se pueden ensamblar mediante cualquier número de combinaciones. Los ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X<sup>Z</sup> son:



35 en el que el subíndice q es 0 o 1, y el subíndice r es 1 a 24, preferentemente 2 a 4. Estos segmentos pueden combinarse, como se muestra a continuación:



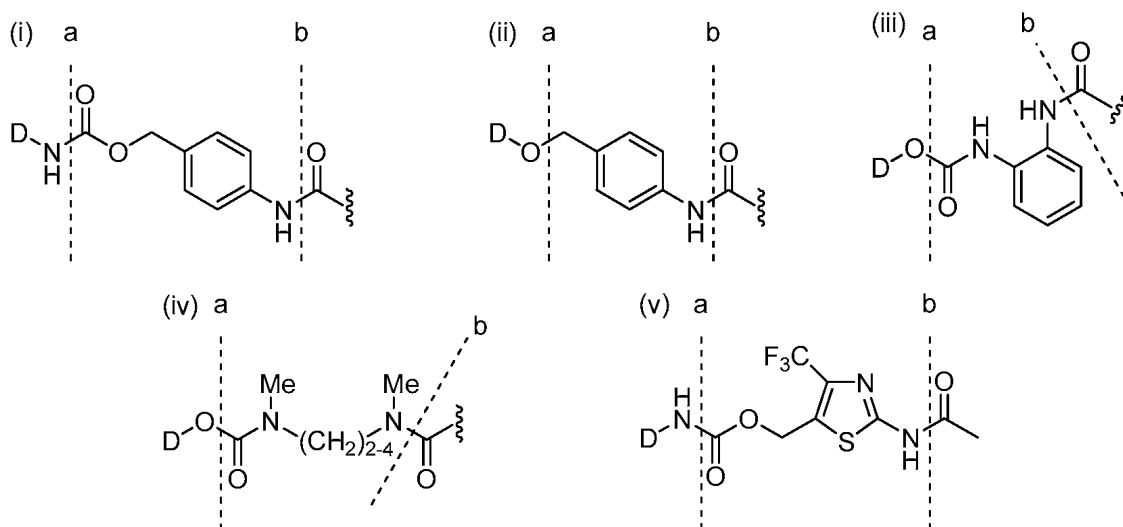
45 El espaciador X<sup>D</sup>, si está presente, proporciona una separación espacial entre el grupo C y el compuesto D, para que el último interfiera estérica o electrónicamente con la escisión del primero. El espaciador X<sup>D</sup> también puede servir para introducir la masa molecular y funcionalidad química adicionales en un conjugado. En general, la masa y funcionalidad adicionales afectarán la vida media en suero y otras propiedades del conjugado. Por lo tanto, a través de la selección prudente de grupos espaciadores, la vida media en suero de un conjugado puede modularse. El espaciador X<sup>D</sup> también puede ensamblarse de segmentos modulares, como se describió anteriormente en el contexto del espaciador X<sup>Z</sup>.

50 Los espaciadores X<sup>Z</sup> y/o X<sup>D</sup>, cuando están presentes, proporcionan preferentemente una separación lineal de 5 a 15 átomos, más preferentemente de 5 a 20 átomos, entre Z y C o D y C, respectivamente.

55 Bien el espaciador X<sup>Z</sup> o X<sup>D</sup>, o ambos, pueden comprender un resto autoinmolante. Un resto autoinmolante es un resto que (1) se une al grupo C y bien al anticuerpo Z o bien a la citotoxina D y (2) tiene una estructura tal que la escisión del grupo C inicia una secuencia de reacción que da como resultado que la porción autoinmolante se

desprenda del anticuerpo Z o citotoxina D, según el caso. En otras palabras, la reacción en un sitio distal del anticuerpo Z o citotoxina D (escisión del grupo C) causa que el enlace  $X^Z-Z$  o  $X^D-D$  se rompa también. La presencia de un resto autoinmolante es deseable en el caso del espaciador  $X^D$ , porque si después de la escisión del conjugado, el espaciador  $X^D$  o una porción del mismo permanece unido a la citotoxina D, la actividad biológica de la última puede verse perjudicada. El uso de un resto autoinmolante es, en especial, deseable cuando el grupo C escindible es un polipéptido.

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

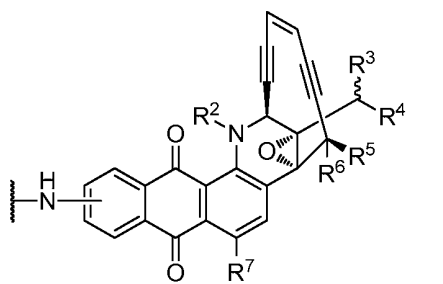


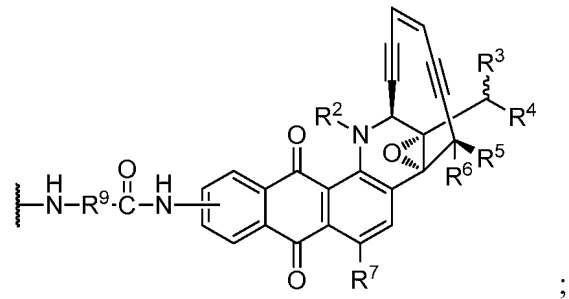
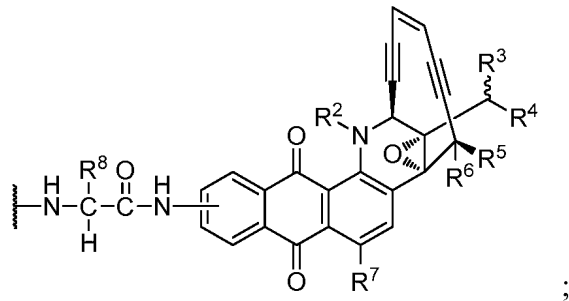
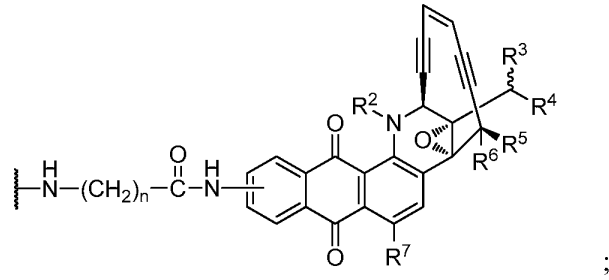
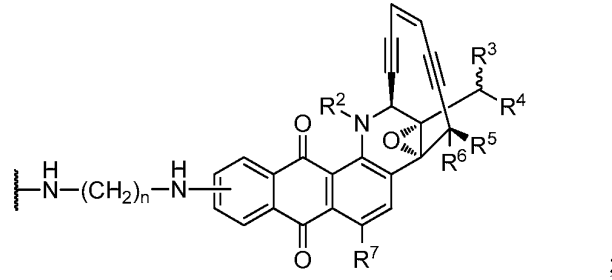
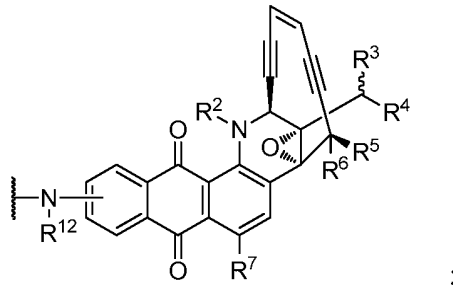
El resto autoinmolante es la estructura entre las líneas punteadas a y b; con características estructurales adyacentes mostradas para proporcionar contexto. Los restos autoinmolantes (i) y (v) se unen a un compuesto D-NH<sub>2</sub> (es decir, el compuesto D se conjuga a través de un grupo amino), mientras que los restos autoinmolantes (ii), (iii) y (iv) se unen a un compuesto D-OH (es decir, el compuesto D se conjuga a través de un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace de amida en la línea punteada b libera el nitrógeno de amida como un nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacción que da como resultado la escisión del enlace en la línea punteada a y la consecuente liberación de D-OH o D-NH<sub>2</sub>, según el caso. Para descripciones adicionales con respecto a las porciones autoinmolantes, véase Carl et al., J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl et al., WO 81/01145 (1981); Dubowchik et al., Pharmacology & Therapeutics, 83, 67-123 (1999); Firestone et al., US 6.214.345 B1 (2001); Toki et al., J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002); Doronina et al., Nature Biotechnology 21 (7), 778-784 (2003) (erratum, p. 941); Boyd et al., US 7.691.962 B2; Boyd et al., US 2008/0279868 A1; Sufi et al., WO 2008/083312 A2; Feng, US 7.375.078 B2 y Senter et al., US 2003/0096743 A1, cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

En otra realización, un resto que marca como diana de anticuerpo y el compuesto D citotóxico se enlazan por un enlazante no escindible. La degradación del anticuerpo a la larga reduce el enlazante a una pequeña porción anexa que no interfiere en la actividad biológica del compuesto D citotóxico.

#### Composiciones de compuesto D-enlazante

En los compuestos de la presente invención, la conjugación se lleva a cabo preferentemente a través de un enlace a un grupo R<sup>0</sup>, como se define en la fórmula (I). Preferentemente, R<sup>0</sup> es NHR<sup>1a</sup>. Donde R<sup>1a</sup> es H o alquilo, el enlace puede ser al nitrógeno de R<sup>1a</sup>NH. Donde R<sup>1a</sup> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, C(=O)CHR<sup>8</sup>NH<sub>2</sub> o C(=O)R<sup>9</sup>NH<sub>2</sub>, la conjugación puede llevarse a cabo a través del grupo amino (NH<sub>2</sub>) de R<sup>1a</sup>. Por lo tanto, dependiendo de la estructura de R<sup>1a</sup>NH, D puede representarse como:



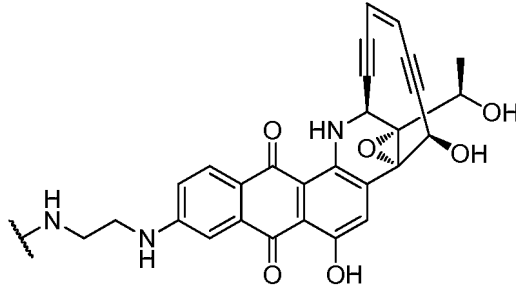
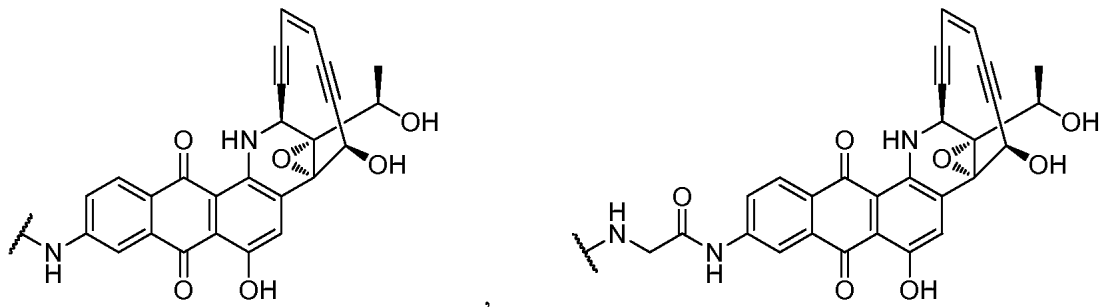


10 en el que R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, y R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y n son como se definen con respecto a la fórmula (I).

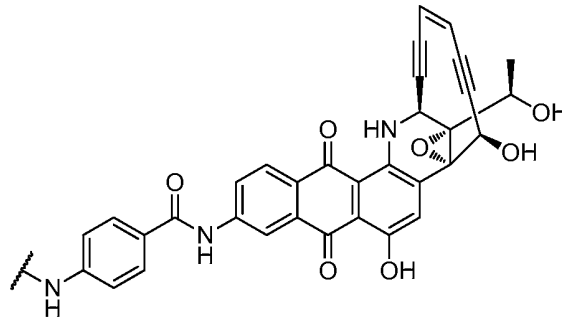
Las estructuras correspondientes pueden derivar de las fórmulas (Ia), (Ib) o (Ic) a través de (Id), cambiando lo que haya que cambiar.

15 Preferentemente, D es

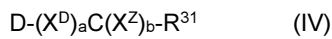




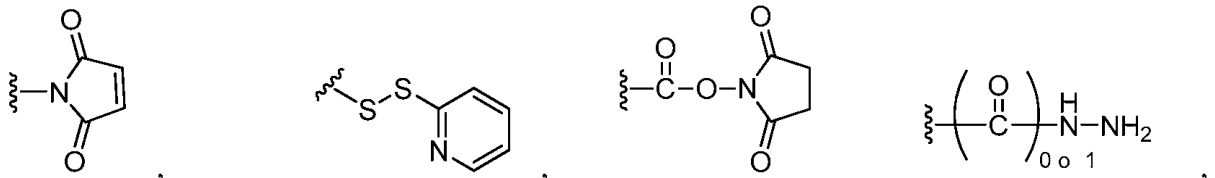
o



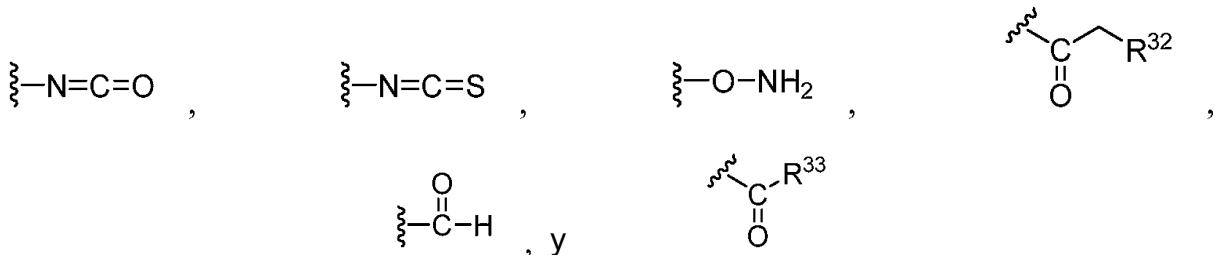
10 Los conjugados de la presente invención se preparan, preferentemente, uniendo primero un compuesto D y un enlazante  $(X^D)_aC(X^Z)_b$  para formar una composición de fármaco-enlazante representada por la fórmula (IV):



15 donde  $R^{31}$  es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo Z para formar el conjugado. Los ejemplos de grupos  $R^{31}$  incluyen azida, ciclooctina,



20



donde  $R^{32}$  es Cl, Br, F, mesilato o tosilato, y  $R^{33}$  es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimidilo, -O-(4-nitrofenilo),

5 -O-pentafluorofenilo u -O-tetrafluorofenilo. La química generalmente utilizable para la preparación de restos adecuados  $D-(X^D)_aC(X^Z)_b-R^{31}$  se describe en Ng et al., US 7,087,600 B2 (2006); Ng et al., US 6,989,452 B2 (2006); Ng et al., US 7,129,261 B2 (2006); Ng et al., WO 02/096910 A1; Boyd et al., US 7,691,962 B2; Chen et al., US 7,517,903 B2 (2009); Gangwar et al., US 7,714,016 B2 (2010); Boyd et al., US 2008/0279868 A1; Gangwar et al., US 7,847,105 B2 (2010); Gangwar et al., US 7,968,586 B2 (2011); Sufi et al., US 2010/0145036 A1 y Chen et al., US 2010/0113476 A1; cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

10 Preferentemente, el grupo funcional reactivo  $-R^{31}$  es  $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SH$ , maleimida, ciclooctino, azido ( $-N_3$ ), hidroxilamino ( $-ONH_2$ ) o N-hidroxisuccinimido.

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

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

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

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

25 Un grupo  $-SH$  es, en particular, útil para la conjugación cuando el anticuerpo se ha modificado para introducir a este un grupo maleimida, en una reacción de adición de Michael que es la "imagen especular" de lo descrito anteriormente. Los anticuerpos se pueden modificar para tener grupos maleimida con 4-(maleimidometil)-ciclohexancarboxilato de N-succinimidilo (SMCC) o su variante sulfonada sulfo-SMCC; ambos reactivos están disponibles de Sigma-Aldrich.

30 Los grupos azida y ciclooctino son grupos funcionales complementarios que pueden llevar a cabo la conjugación a través de la denominada "química clic" libre de cobre, en la cual la azida se añade a través del enlace de alquino tensionado del ciclooctino para formar un anillo 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard et al., J. Amer. Chem. Soc. 2004, 126, 15046-15047; Best, Biochemistry 2009, 48, 6571-6584. La azida puede ser el grupo funcional reactivo  $R^{31}$  en la fórmula (IV), y el ciclooctino puede situarse en el anticuerpo o en una porción del mismo de unión al antígeno, o viceversa. Puede proporcionarse un grupo ciclooctino mediante un reactivo DIBO (disponible de Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón).

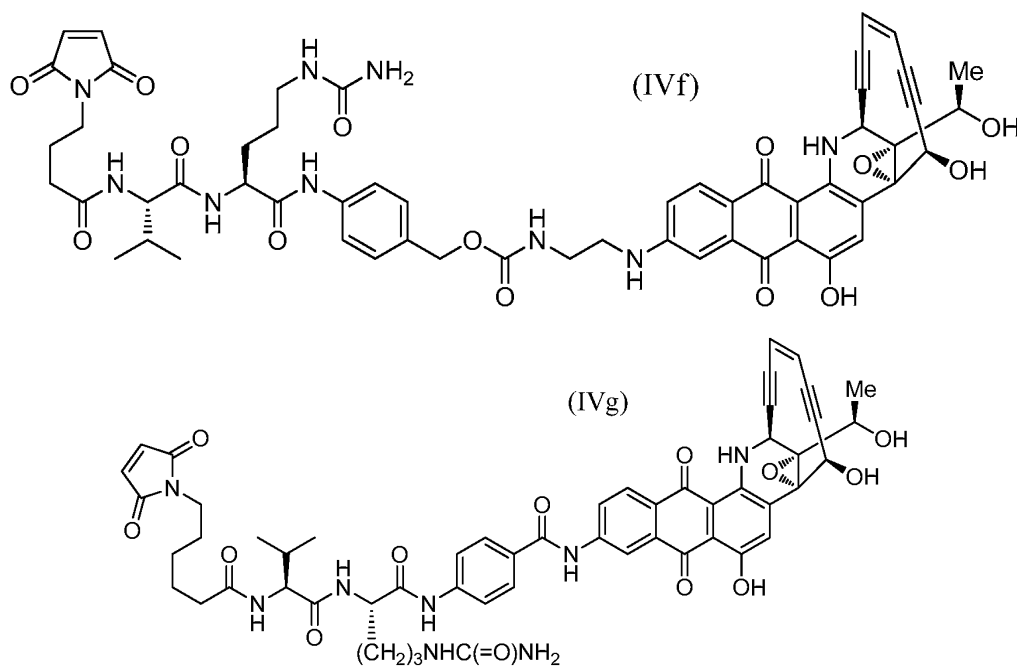
40 Pueden utilizarse técnicas para introducir aminoácidos no naturales en anticuerpos; proporcionando el aminoácido no natural una funcionalidad para la conjugación con el grupo funcional reactivo. Por ejemplo, el aminoácido p-acetilfenilalanina no natural puede incorporarse en un anticuerpo, como puede verse en Tian et al., WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en la p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación mediante la formación de una oxima con un grupo funcional reactivo hidroxilamino.

45 Puede usarse un grupo amina ( $NH_2$ ) para la conjugación usando la enzima transglutaminasa, como puede verse en Jeger et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9995-9997.

50 La conjugación también puede llevarse a cabo usando la enzima Sortasa A, como se explica en Levary et al., PLoS One 2011, 6(4), e18342; Proft, Biotechnol. Lett. 2010, 32, 1-10; Ploegh et al., WO 2010/087994 A2 (2010); y Mao et al., WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de la Sortasa A (normalmente LPXTG, donde X es cualquier aminoácido natural) puede ubicarse en el ligando Z, y el motivo de aceptor nucleofílico (normalmente GGG) puede ser el grupo  $R^{31}$  en la fórmula (IV), o viceversa.

55 Los ejemplos de composiciones de acuerdo con la fórmula (IV) incluyen aquellos que tienen estructuras representadas por las fórmulas (IVa)-(IVg):





## 5 Preparación de conjugados

Lo siguiente es un procedimiento ilustrativo, con base en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo mediante la reacción de grupos  $\epsilon$ -amino de lisina con 2-iminotiolano, seguido de la reacción con una porción de fármaco-enlazante que contiene maleimida, como se describió anteriormente. Inicialmente al anticuerpo se le cambia el tampón por tampón de fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA) 2 mM y se concentra a 5-10 mg/ml. La tiolación se logra a través de la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano que se añade se puede determinar mediante un experimento preliminar y varía de anticuerpo a anticuerpo. En el experimento preliminar, una titulación de cantidades incrementadas de 2-iminotiolano se añade al anticuerpo, y después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h a TA (temperatura ambiente, alrededor de 25 °C), el anticuerpo se desala en tampón de HEPES pH 6,0 50 mM usando una columna SEPHADEX™ G-25, y el número de grupos tiol introducidos se determina rápidamente mediante reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, la cual se puede monitorear en forma espectroscópica a 324 nm. Normalmente se usan muestras a una concentración de proteínas de 0,5-1,0 mg/ml. La absorbancia a 280 nm se puede usar para determinar precisamente la concentración de proteínas en las muestras, y luego se incuba una alícuota de cada muestra (0.9 ml) con 0.1 ml de DTDP (solución madre en etanol 5 mM) durante 10 min a TA. Las muestras blanco del tampón solo más DTDP también se incuban juntas. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm, y se cuantifica el número de grupos tiol usando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19.800 M<sup>-1</sup>.

Normalmente es deseable un nivel de tiolación de aproximadamente tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos, esto se puede lograr añadiendo un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguido por incubación a TA durante 1 h. El anticuerpo luego se incuba con 2-iminotiolano en la relación molar deseada y luego se desala en el tampón de conjugación (tampón HEPES pH 6,0 50 mM que contiene glicina 5 mM y DTPA 2 mM). El material tiolado se conserva en hielo, mientras que se cuantifica el número de tioles introducidos, como se describió anteriormente.

Después de la verificación del número de tioles introducidos, la porción de fármaco enlazante se añade a un exceso molar de 3 veces por tiol. La reacción de conjugación se deja proceder en el tampón de conjugación que también contiene una concentración final de 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) o un disolvente alternativo similar. Comúnmente, la solución madre de fármaco enlazante se disuelve en 100 % de DMSO. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado, el cual tiene suficiente DMSO añadido para obtener la concentración final al 10 %, o se prediluye en tampón de conjugación que contiene una concentración final de 10 % de DMSO, y seguido de adición a un volumen igual de anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incuba a TA durante 2 h con agitación. Después de la incubación, la mezcla de reacción de conjugación se centrifuga y se filtra a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . La purificación del conjugado se puede lograr a través de cromatografía usando un número de métodos. En un método, el conjugado se purifica usando cromatografía por exclusión de tamaño en una columna SEPHACRYL™ S200 pre-equilibrada con tampón de HEPES pH 7,2 50 mM que contiene glicina 5 mM y NaCl 50 mM. La cromatografía se realiza a una velocidad de flujo lineal de 28 cm/h. Las fracciones que contienen conjugado se recolectan, se agrupan y se

concentran. En un método alternativo, la purificación puede lograrse a través de cromatografía de intercambio iónico. Las condiciones varían de anticuerpo a anticuerpo y deben ser optimizadas en cada caso. Por ejemplo, la mezcla de reacción del conjugado de anticuerpo-fármaco se aplica a una columna SP-SEPHAROSE™ pre-equilibrada en HEPES pH 5,5 50 mM que contiene glicina 5 mM. El conjugado de anticuerpo se eluye usando un gradiente de NaCl 0-1 M en un tampón de equilibrado a pH 5,5. Las fracciones relevantes que contienen el conjugado se agrupan y se dializan contra el tampón de formulación (tampón de HEPES pH 7,2 50 mM que contiene glicina 5 mM y NaCl 100 mM).

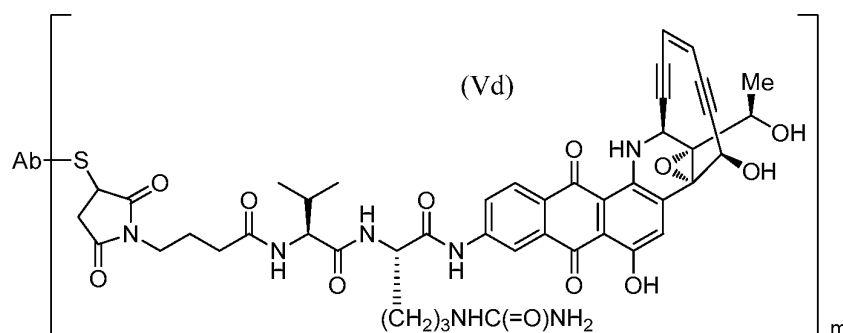
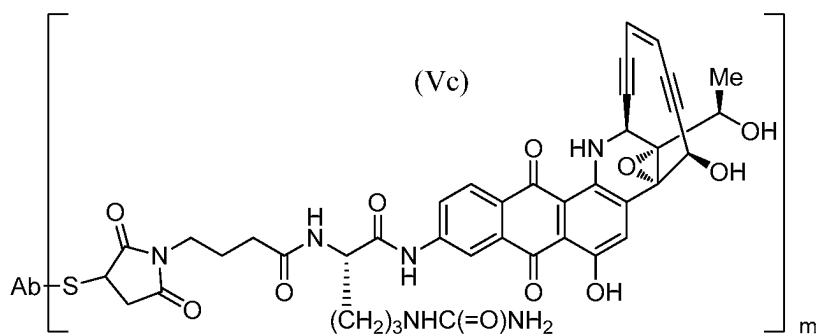
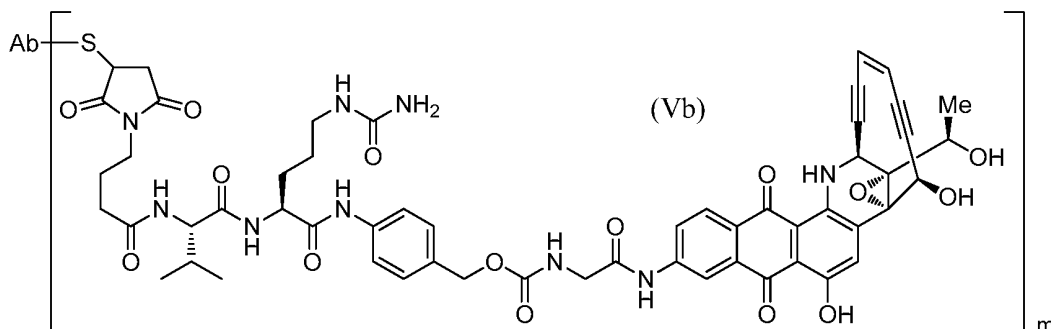
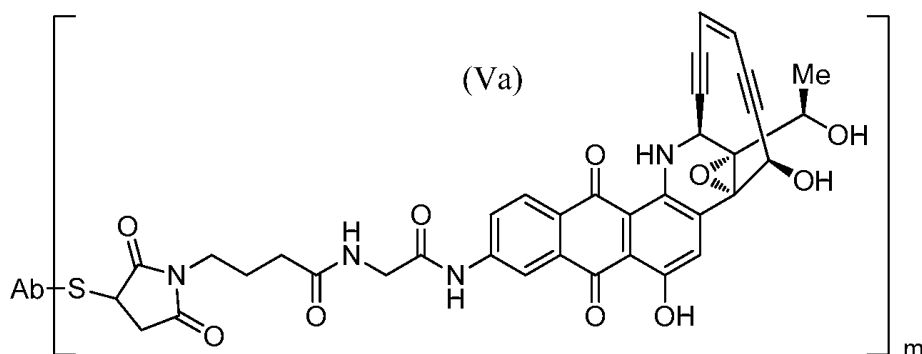
5

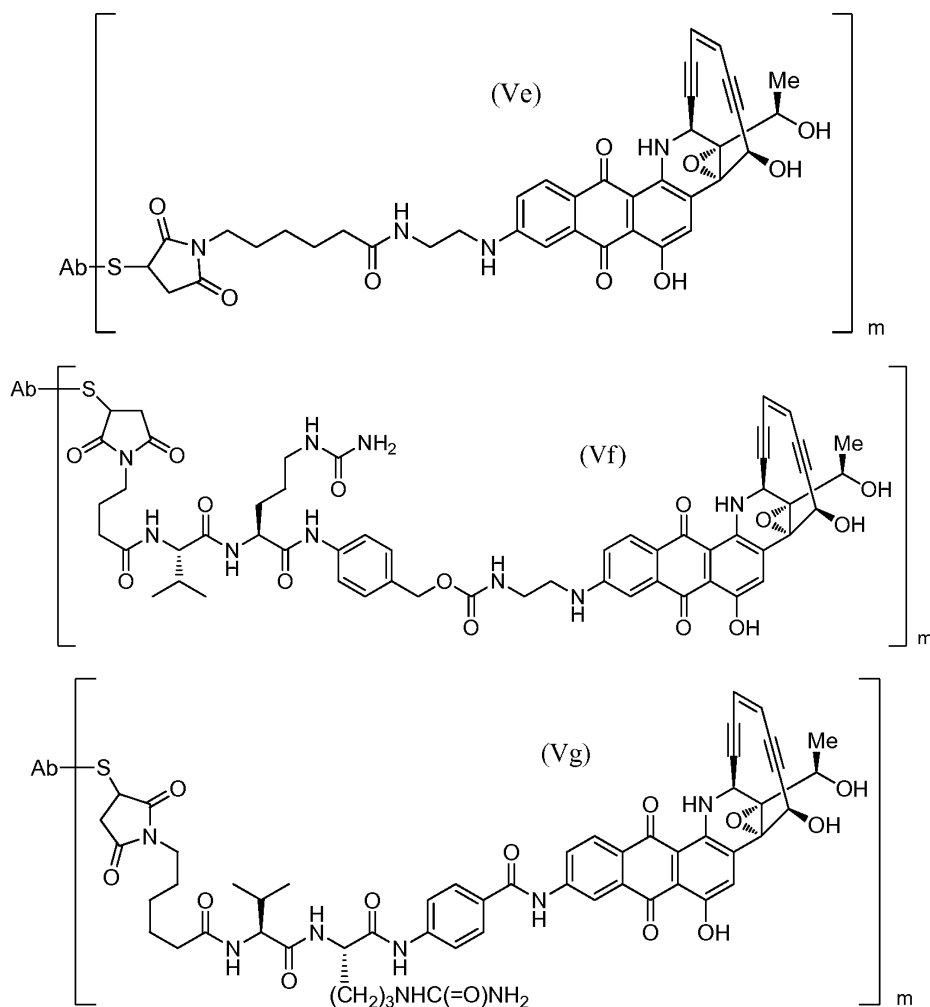
Los expertos en la materia comprenderán que las condiciones antes descritas y la metodología son a modo de ejemplo y no limitantes, y que otros procedimientos para la conjugación se conocen en la técnica y son utilizables en la presente invención.

10

Las estructuras de algunos conjugados preferidos de acuerdo con la presente invención se muestran por las fórmulas (Va) a (Vg), donde Ab representa un anticuerpo, y m es 1, 2, 3 o 4:

15





ACTIVIDAD BIOLÓGICA

- 10 Los datos sobre la actividad biológica de los compuestos y conjugados de la presente invención se proporcionan en los Ejemplos 13 y 14 de la presente memoria descriptiva.

Los expertos en la materia apreciarán que cuando los compuestos de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib), donde el grupo R<sup>1a</sup> es H<sub>2</sub>NCHR<sup>b</sup>C(=O) - tal como se ejemplifica en los compuestos (IIb), (IIf), (IIg) o (IIh) - se usan en un conjugado, la porción R<sup>1a</sup> puede ser parte de un enlazante de peptidilo escindible enzimáticamente cuya escisión no regenera el compuesto original - por ejemplo, (IIb), (IIf), (IIg) o (IIh) - sino el compuesto (IIa).

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o de un conjugado del mismo, formulada junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. Puede contener, opcionalmente, uno o más ingredientes farmacéuticamente activos adicionales, tales como un anticuerpo u otro fármaco. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una terapia de combinación con otro agente terapéutico, en especial otro agente anticanceroso.

25 La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes. Los excipientes que se pueden usar incluyen vehículos, agentes de superficie activa, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, auxiliares de dispersión o suspensión, solubilizantes, colorantes, agentes saborizantes, recubrimientos, agentes disgregantes, lubricantes, endulzantes, conservadores, agentes isotónicos y combinaciones de los mismo. La selección y uso de excipientes adecuados se explica en Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003), cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia.

35 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de

administración, el compuesto activo puede recubrirse en un material para protegerlo de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivarlo. La frase "administración parenteral" significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, usualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal. De manera alternativa, la composición farmacéutica se puede administrar a través de una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

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

15 La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se trata y el modo particular de administración, y en general, será la cantidad de la composición la cual produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, muy preferentemente de aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento de ingrediente activo, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente, como se indica por las exigencias de la situación. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se tratarán; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

35 La dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Los regímenes de tratamiento a modo de ejemplo son la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada tres meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación preferidos incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal a través de la administración intravenosa, usando uno de los siguientes programas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración del anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml, en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención preferentemente da como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de la alteración o incapacidad debido a la aflicción por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos que portan tumores, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe, preferentemente, el crecimiento de tumor en al menos aproximadamente un 20 %, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 40 %, aún más preferentemente, en al menos aproximadamente un 60 %, y aún más preferentemente, en al menos aproximadamente un 80 %, con respecto a los sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otro modo mejorar los síntomas en un sujeto, el cual es normalmente un ser humano pero puede ser otro mamífero.

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

60 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse a través de dispositivos médicos, tales como (1) dispositivos de inyección hipodérmica sin aguja (por ejemplo, documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413. 4.941.880. 4.790.824 y 4.596.556); (2) bombas de microinfusión (documento US 4.487.603); (3) dispositivos transdérmicos (documento US 4.486.194); (4) aparatos de infusión (documentos US 4.447.233 y 4.447.224); y (5) dispositivos osmóticos (documentos US 4.439.196 y 4.475.196); cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse para asegurar la distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la barrera hematoencefálica, pueden formularse en liposomas, los cuales pueden comprender adicionalmente restos que marcan como diana para mejorar el transporte selectivo a células u órganos específicos. Véase, por ejemplo, los

5 documentos US 4.522.811; 5.374.548; 5.416.016 y 5.399.331; V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685; Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038; Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134; Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; y Killion y Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

## 10 USOS

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden usarse para tratar enfermedades, tales como enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de cabeza y cuello los cuales incluyen tumores de la cabeza,

15 cuello, cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas; cánceres del hígado y vías biliares, en particular carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, en particular cáncer colorrectal; cáncer de ovarios; cáncer pulmonar de células pequeñas y no pequeñas (SCLC y NSCLC, por sus siglas en inglés); sarcomas de cáncer de mama, tal como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma embrionario, leiomyosarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma,

20 sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma alveolar de partes blandas; leucemias tales como leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), leucemia mielógena aguda (AML, por sus siglas en inglés), leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) y leucemia mielógena crónica (CML, por sus siglas en inglés); neoplasias del sistema nervioso central, en particular cáncer de cerebro, mieloma múltiple (MM), linfomas tales como linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas,

25 linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma anaplásico de células grandes de linfocitos T. Clínicamente, la práctica de los métodos y uso de las composiciones descritas en la presente dará como resultado una reducción del tamaño o el número del crecimiento canceroso y/o una reducción de los síntomas asociados (cuando corresponda). Patológicamente, la práctica del método y uso de las composiciones descritas en la presente producirá una respuesta patológicamente relevante, tal como: la inhibición

30 de la proliferación de células cancerosas, la reducción del tamaño del cáncer o tumor, la prevención de metástasis adicional y la inhibición de angiogénesis de tumor. El método de tratamiento de tales enfermedades comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención a un sujeto. El método se puede repetir según sea necesario. En especial, el cáncer puede ser cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios,

35 mieloma múltiple, cáncer renal, leucemia (en especial, ALL, APL o AML) o linfoma.

Los compuestos de la presente invención o sus conjugados pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de la angiogénesis, antimetabolitos, escindidores de ADN, reticulantes de ADN, intercalantes de ADN, aglutinantes de la ranura menor de ADN,

40 enediinos, inhibidores de la proteína de choque térmico 90, inhibidores de histona desacetilasa, inmunomoduladores, estabilizadores de microtúbulos, análogos de nucleósido (purina o pirimidina), inhibidores de la exportación nuclear, inhibidores del proteasoma, inhibidores de topoisomerasa (I o II), inhibidores de tirosina cinasa, e inhibidores de serina/treonina cinasa. Los agentes terapéuticos específicos incluyen adalimumab, ansamitocina P3, auristatina, bendamustina, bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfan, callistatina A,

45 camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, cisplatino, cladribina, citarrabina, criptoficinas, dacarbazina, dasatinib, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, epotilonas, etopósido, floxurridina, fludarrabina, 5-fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, ipilimumab, hidroxíurea, imatinib, infliximab, interferones, interleucinas,  $\beta$ -lapacona, lenalidomide, irinotecan, maitansino, mecloretamina, melfalan, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitomicina C, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), 6-tioguanidina, tiotepa, tenipósido, topotecan, trastuzumab, tricostatina A, vinblastina,

50 vincristina y vindesina.

## Ejemplos

55 La práctica de la presente invención puede entenderse adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación.

### *Ejemplo 1 - Compuesto (IIa)*

60 Este ejemplo describe la preparación del compuesto (IIa) u 8-aminouncialamicina. El esquema sintético para su preparación se muestra en la **Figura 1**, en la que se etiqueta como compuesto **9**.

(3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il)carbamato de 2,2,2-tricloroetilo **2**. A una suspensión de 6-aminoisobenzofuran-1(3H)-ona **1** (Maybridge, 13,43 g, 90 mmol) en diclorometano (DCM, 200 ml) a 0 °C, se añadió carbonocloridato de 2,2,2-tricloroetilo **1a** (18,23 ml, 135 mmol) y piridina (17,79 ml, 180 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (TA, casi 25 °C) durante 1 h. La cromatografía de capa delgada (TLC) y la cromatografía

65



líquida de alta resolución (HPLC) mostraron que la reacción se completó. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con DCM (2 x 30 ml) para proporcionar el carbamato **2** como un sólido blanco (17,03 g, 58 %). LCMS: [M+1] = 324.

**Hidroxifitalida 3.** Una suspensión de carbamato **2** (17,0 g, 52,4 mmol), N-bromosuccinimida (NBS, 10,26 g, 57,6 mmol) en CCl<sub>4</sub> (150 ml) se agitó y se calentó a reflujo (85 °C en baño de aceite). La mezcla de reacción se expuso a la luz de una lámpara solar que se ubicó aproximadamente a 10 cm del matraz. Después de 2 h, la TLC mostró que la reacción se completó. La HPLC mostró múltiples picos debido a la naturaleza lábil del intermediario bromuro. La concentración en un evaporador giratorio proporcionó un sólido marrón. Se añadió agua (200 ml) al sólido marrón *in situ* y se calentó a reflujo durante 5 h para producir una solución casi clara con algo de material insoluble. La TLC y la HPLC mostraron que la reacción se completó. La concentración en un evaporador giratorio seguida por la purificación con una unidad COMBIFLASH™ usando un gradiente de 0-50 % de EtOAc en hexanos en una columna de sílice de 120 g proporcionó la hidroxifitalida **3** (13,55 g, 76 %). LCMS: [M+1] = 340.

**Cianofitalida 5.** A una suspensión de hidroxifitalida **3** (1,391 g, 4,09 mmol) y cianuro de potasio (399 mg, 6,14 mmol, 1,5 equiv.) en agua (4 ml), se añadió lentamente 33 % de HCl acuoso (1.2 ml) a 0 °C (baño de hielo). El baño de hielo se retiró, y la agitación continuó durante 2 h. La LCMS (m+1 = 368) mostró la formación del compuesto **4**. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a 20 ml. Después del enfriamiento a 0 °C, la solución se trató con diciclohexil carbodiimida (DCC, 1,2 equiv.), y la agitación continuó a TA durante 8 h. La mezcla de reacción se filtró para retirar el subproducto de urea, y el filtrado se concentró mediante cromatografía de columna instantánea con gradiente de 30 % EtOAc/hexano para producir la cianofitalida **5** (1,116 g, 78 % de rendimiento) como un sólido blanco. NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,10 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,93 (dd, J = 8,8, 2,0 Hz, 1H), 7,67 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 4,87 (s, 1H).

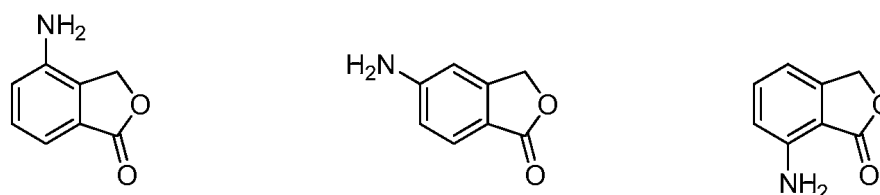
**Aminocianofitalida 6.** Se añadió zinc (8,58 g, 131 mmol) a una solución de cianofitalida **5** (3 g, 8,58 mmol) en ácido acético (82 ml) y agua (4,3 ml) a temperatura ambiente. Después de 30 min, la TLC y la HPLC mostraron que la reacción se completó con una relación 3:1 de producto y subproducto monodesclorado. La filtración sobre CELITE™ y lavado con EtOAc (50 ml) y agua (50 ml), seguido de concentración y purificación en una columna de sílice COMBIFLASH™ de 40 g usando gradiente de 0-50 % EtOAc/hexano proporcionó la aminocianofitalida **6** como un sólido blanco (980 mg, 66 % de rendimiento). NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,05 (dd, J = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H).

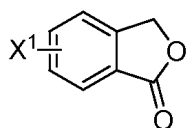
**8-Aminouncialamicina-OTES 8.** Se empleó un procedimiento de anulación de Hauser. A una solución de aminocianofitalida **6** (155 mg, 0,891 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 5,3 ml) a -70 °C, se añadió bis(trimetilil)amida de litio (LiHMDS, 1,782 ml, 1,782 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min. Se añadió una solución enfriada previamente de iminoquinona **7** (hecha por Nicolaou et al. 2007a, 125 mg, 0,297 mmol) en THF (12,5 ml). La mezcla de reacción luego se agitó a la misma temperatura durante 5 min, y luego se calentó lentamente a TA durante 30 min. La reacción se inactivó con tampón fosfato (pH 6,8, 100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 75 ml). Los extractos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> para proporcionar el producto bruto. La purificación en una columna de gel de sílice COMBIFLASH™ de 12 g usando un gradiente de 0-50 % EtOAc/hexanos proporcionó el producto **8** como un sólido púrpura (60 mg, 36 % de rendimiento). LCMS:

[M+1] = 569. NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 13,14 (s, 1H), 9,96 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 8,40 (m, 1H), 8,03 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 7,38 (m, 1H), 7,02 (td, J = 8,0 Hz, J = 1,6 Hz, 1H), 5,92 (dd, J = 24, 9,6 Hz, 2H), 5,20 (s, 2H), 5,12 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 4,94 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,55 (q, J = 6,4 Hz, 1H), 4,46 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 3,41 (m, 1H), 1,40 (d, J = 6,0 Hz, 3H), 1,00 (t, J = 8,0 Hz, 9H), 0,68 (q, J = 7,2 Hz, 3H).

**8-Aminouncialamicina 9.** Se disolvió aminouncialamicina-OTES **8** (30 mg) en THF (3 ml) y se trató con una solución de Et<sub>3</sub>N·3HF en THF (1:1, 1,5 ml) a TA. Después de 1 h, se completó la desililación como se monitorizó por TLC y HPLC. La mezcla de reacción se recuperó en EtOAc, se lavó con solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. La purificación en una columna de gel de sílice COMBIFLASH™ usando un gradiente de 0-55 % EtOAc/hexanos proporcionó la 8-aminouncialamicina **9** como un sólido púrpura (80 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 455.

Los expertos en la materia comprenderán que las variantes del compuesto (IIa) con el grupo amino ubicado en otras posiciones del anillo pueden hacerse usando como material de partida variantes del compuesto **1** con su grupo amino en cualquier parte en el anillo o se reemplaza por un grupo diferente, como en:





X<sup>1</sup> = F, Cl, Br, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NHMe, o OH

#### Ejemplo 2 - Compuestos (IIb), (IIg) y (IIh)

5 Aunque el grupo 8-amino en 8-aminouncialamicina no es especialmente reactivo, puede amidarse con un cloruro de  $\alpha$ -aminoácido en presencia de cianuro de plata. La Figura 2 muestra procedimientos ilustrativos para preparar los compuestos (IIb), (IIh) y (IIg) mediante este procedimiento. En la Figura 2, los compuestos (IIb), (IIh) y (IIg) están etiquetados 13a, 13b y 13c', respectivamente.

10 *Fmoc-Gly-NH-uncialamicina-OTES 11a*. Se disolvieron aminouncialamicina-OTES 8 (5 mg) y cloruro de glicinilo protegido por Fmoc 10a (Chem-Impex, 8,4 mg, 3 equiv.) en acetonitrilo (2 ml) y se agitaron en presencia de AgCN (7 mg, 6 equiv.) durante la noche. La reacción se completó como se monitorizó mediante TLC y HPLC. La concentración y la purificación en una columna de gel de sílice COMBIFLASH™ usando un gradiente de 0-40 % EtOAc/hexanos proporcionaron el producto 11a como un sólido púrpura (90 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 848.

15 *Fmoc-Gly-NH-uncialamicina 12a*. El producto 11a (4 mg) se disolvió en THF (0,5 ml) y se trató con una solución de Et<sub>3</sub>N•3HF•THF (1:1, 0,25 ml) a TA. Después de 1 h, se completó la desililación como se monitorizó mediante TLC y HPLC. La mezcla de reacción se recuperó en EtOAc, se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. La purificación en una columna de gel de sílice COMBIFLASH™ usando un gradiente de 0-55 % EtOAc/hexanos proporcionó el compuesto 12a como un sólido púrpura (80 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 734.

20 *Gly-NH-uncialamicina 13a*. El compuesto 12a (2 mg) se trató con 20 % de piperidina en N,N-dimetilformamida (DMF, 1 ml) a TA durante 15 min. Mediante la concentración y la purificación usando HPLC de fase inversa (R-HPLC) con 0,1 % de TFA en eluyente de acetonitrilo/agua como eluyente se proporcionó el compuesto 13a (50 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 512.

30 Los compuestos análogos de lisina y serina 13b y 13c' se prepararon usando los mismos procedimientos generales. Los cloruros ácidos 10b y 10c se prepararon de los ácidos carboxílicos correspondientes (ambos de Chem-Impex) mediante la reacción con cloruro de tionilo o reactivo de Ghosez. La retirada del grupo TES del compuesto 13c se puede realizar con ácido acético. Compuesto 13b: LCMS [M+1] = 583,2; compuesto 11c: LCMS [M+1] = 770,3.

#### Ejemplo 3 - Compuesto (IIf)

35 El procedimiento del ejemplo previo no fue utilizable con citrulina debido a la inestabilidad del cloruro ácido de citrulina. Se ideó un procedimiento sintético alternativo, en el cual la citrulina se unió a la ftalida antes de la condensación con el compuesto 7, como se muestra en la Figura 3, para producir el compuesto (IIf), etiquetado como 17 en la Figura.

40 *Cianoftalida acoplada a Fmoc-citrulina 14*. Se agitaron la citrulina protegida por Boc 6a (Chem-Impex, 0,726 g, 2,64 mmol) y clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, 0,578 g, 2,9 mmol) en DCM:DMF (17:3,20 ml) a TA durante 30 min. Luego se añadió aminocianoftalida 6 (0,23 g, 1,32 mmol) y se agitó a TA durante 18 h. La mezcla de reacción se elaboró con acetato de etilo, se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y adicionalmente se lavó con agua y salmuera. La concentración y la purificación con una columna COMBIFLASH eluyendo con 17 % de MeOH en DCM proporcionaron la cianoftalida 14 (40 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 432. NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  10,50 (s, 1H), 8,37 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,91 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,72 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,02 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,36 (m, 9H). NMR <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  172,7, 168,3, 159,3, 156,0, 141,9, 137,0, 126,7, 125,0, 124,5, 115,7, 114,8, 78,5, 66,7, 55,3, 29,4, 28,6, 27,3.

50 *Compuesto 15*. Se trató la ftalida 14 con DCM-ácido trifluoroacético (TFA) (1:1) para proporcionar el compuesto 15. LCMS: [M+1] = 332.

55 *Compuesto 17*. Sin purificación adicional, la sal de TFA del compuesto 15 se sometió a anulación de Hauser con iminoquinona 7, usando las condiciones generales descritas anteriormente para proporcionar el compuesto protegido por TES 16 (10 % de rendimiento). La desililación del compuesto 16 con Et<sub>3</sub>N•3HF seguida de R-HPLC usando 0,1 % de TFA en CH<sub>3</sub>CN/agua proporcionó el compuesto 17. LCMS: [M+1] = 612.

#### Ejemplo 4 - Compuesto (IIc)

60 La Figura 4 muestra un esquema para la síntesis del compuesto (IIc), etiquetado como 22 en la Figura.

*Compuesto 19*. A una solución de aminocianoftalida 6 (300 mg, 1,723 mmol), compuesto 18 (Aldrich-Sigma, 823 mg,

5,17 mmol) y ácido acético (5 equiv.) en  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  (30 ml), se añadió triacetoxi borohidruro de sodio (3 equiv.) y se agitó a TA durante 5 h. La HPLC mostró un 90 % de conversión. La mezcla de reacción se recuperó en DCM (100 ml) y se lavó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (50 ml). La concentración y la purificación usando una columna COMBIFLASH™ con 40 % EtOAc/hexanos como eluyente proporcionaron el compuesto **19**. NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,53 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,07 (dd, J = 8,8, 2,4 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,85 (s a, 1H), 6,56 (s, 1H), 4,0 (s a, 1H), 3,06-3,13 (m, 4H), 1,34 (m, 9H).

**Compuestos 20a.** El compuesto **19** se disolvió en DCM (6 ml) y se trató con TFA (3 ml) a 0 °C. La temperatura se dejó elevar a TA y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min. La HPLC mostró que la reacción se completó. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un material gomoso, el cual se lavó con éter (2 x 20 ml), se disolvió en acetonitrilo/agua y se liofilizó para producir el compuesto **20a** (601 mg, 78 % de rendimiento). LCMS:  $[\text{M}+1] = 218$ .

**Compuesto 20b.** A una solución del compuesto **20a** (200 mg, 0,451 mmol, como sal de bis-TFA) en DMF (2 ml) a 0 °C, se añadió trietilamina (0,314 ml, 2,256 mmol) seguido de (cloro(4-metoxifenil)metileno)dibenceno (167 mg, 0,541 mmol) en DCM (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se elaboró con EtOAc y agua. La purificación en una columna de alúmina neutra usando un 30 % de EtOAc en hexanos proporcionó el producto protegido con p-metoxifenildifenilmetilo (MMT) **20b** como un sólido amarillo pálido (105 mg, 48 % de rendimiento). La pureza se verificó mediante TLC con una fase móvil de trietilamina:EtOAc:hexano (1:30:70). NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,2-7,7 (m, 16H), 7,0 (m, 2H), 6,8 (m, 3H), 6,19 (s, 1H), 4,57 (s a, 1H), 3,77 (m, 3H), 3,28 (m, 2H), 2,50 (m, 2H).

**Compuesto 22.** A una solución del producto **20b** (92 mg, 0,188 mmol) en THF (2 ml) a -70 °C, se añadió LiHMDS (0,376 ml, 0,376 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min. Se añadió una solución previamente enfriada de iminoquinona **7** (52,8 mg, 0,125 mmol) en THF (2,6 ml) y se agitó a la misma temperatura durante 5 min. La mezcla de reacción se calentó lentamente a TA durante 20 min, se inactivó con tampón de fosfato (pH 6,8, 20 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 15 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (30 ml) y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  para proporcionar el producto **21** bruto. El producto no purificado **21** se disolvió en DMSO (2 ml) y se trató con  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  (0,5 ml) a 4 °C y se agitó a TA. Después de 1 h, la LCMS mostró la formación de producto. El producto bruto se purificó en una columna X-Bridge preparativa C18 de 5  $\mu\text{m}$  OBD (30 x 150 mm) usando 0,1 % de TFA en acetonitrilo/agua como fase móvil. La liofilización proporcionó el producto **22** (14,4 mg, 23 % de rendimiento en dos etapas). LCMS  $[\text{M}+1] = 498,3$ .

#### 35 Ejemplo 5 - Compuestos (Ile)

La **Figura 5** muestra un esquema para la síntesis del compuesto (Ile), etiquetado como **25** en la Figura.

**8-Metilaminounicialamicina 25.** A una solución de aminocianoftalida **6** (34 mg, 0,195 mmol), paraformaldehído (11,72 mg, 0,390 mmol) y ácido acético en  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$  (2 ml), se añadió triacetoxi borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 24 h. La HPLC mostró un 90 % de conversión. La mezcla de reacción se recuperó con EtOAc (20 ml) y se lavó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (10 ml). La concentración y la purificación mediante R-HPLC proporcionaron el producto **23** (15 mg, 41 % de rendimiento). MS ( $m+1$ ) = 189. El producto **23** se sometió a anulación de Hauser seguida por la desprotección de TES como se describió anteriormente para proporcionar la 8-metilaminounicialamicina **25**. LCMS: ( $M+1$ ) = 467.

#### 45 Ejemplo 6 - Compuesto (IId)

La **Figura 6** muestra un esquema para la síntesis del compuesto (IId), etiquetado como **30** en la Figura.

**Compuesto 30.** Una combinación de ácido 4-((terc-butoxicarbonil)amino)benzoico **26** (Fluka, 1,885 g, 7,95 mmol) y EDC (1,676 g, 8,74 mmol) en DCM (24 ml) se agitó a TA durante 30 min. Luego, se añadió aminocianoftalida **6** (0,346 g, 1,987 mmol) en DMF (6,00 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 h. La temperatura se elevó a 50 °C; después de 40 h, se retiró el DCM mediante evaporación. El residuo se recuperó en EtOAc. El EtOAc se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado, agua y salmuera. La concentración y la purificación en una unidad COMBIFLASH™ usando un 15 % de MeOH en DCM como eluyente produjeron el compuesto **27** como un sólido amarillo (587 mg, 75 % de rendimiento). LCMS:  $[\text{M}+1] = 394$ . NMR  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10,53 (s, 1H), 9,71 (s, 1H), 8,42 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 8,19 (dd, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,9 (m, 3H), 7,59 (dd, J = 7,2, J = 2,0 Hz, 2H), 6,74 (s, 1H), 1,47 (m, 9H). Este material **27** (567 mg, 1,441 mmol) se suspendió en DCM (2 ml), y se añadió TFA (2 ml, 26,0 mmol). Después de la agitación a TA durante 50 min, la LCMS y HPLC mostraron que la reacción se completó. La concentración y el secado bajo alto vacío durante 2 h proporcionaron el compuesto **28**, el cual se sometió a anulación de Hauser, seguida de la desprotección de TES con  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  como se describió anteriormente para proporcionar el compuesto **30** (18 % de rendimiento). LCMS:  $M+1=574,2$ .

#### 65 Ejemplo 7 - Adaptación del compuesto (IId) para la conjugación

La **Figura 7** muestra esquemas de reacción para adaptar el compuesto (IId) para la conjugación.

**Compuesto 32.** Los compuestos **13a** (1 equiv.) y **31** (Dubowchik et al. 2002; 1,2 equiv.) en DMSO se trataron con N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 3 equiv.) a temperatura ambiente durante 1 h. La purificación mediante R-HPLC usando un 0,1 % de TFA en CH<sub>3</sub>CN/agua como eluyente proporcionó el compuesto **32** (50 % de rendimiento). LCMS: [M+1] = 1082. NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13,12 (s, 1H), 10,62 (s, 1H), 9,67 (m, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,29 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 8,19 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 8,07 (m, 1H), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,57 (m, 2H), 7,29 (m, 2H), 6,98 (m, 1H), 6,65 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 5,99 (dd, J = 30, 9,2 Hz, 2H), 5,38 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 5,14 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 5,03 (m, 1H), 4,97 (s, 1H), 4,16 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 4,08 (q, J = 5,2 Hz, 4H), 3,86 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 3,38 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 2,90 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 1,29 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,83 (m, 6H).

**Compuesto 34.** Una reacción similar del éster de N-hidroxisuccinimida del ácido maleimidobutanoico **33** (TCI) proporcionó el compuesto **34**. LCMS: [M+1] = 677.

#### *Ejemplo 8 - Adaptación del compuesto (Ilf) para la conjugación*

La **Figura 8** muestra esquemas de reacción para adaptar el compuesto (Ilf) para la conjugación.

**Compuesto 38.** A una solución de los compuestos **17** (5 mg) y **35** (Bachem, 10 mg, 22 μmol) en DMF (2 ml), se añadió DIPEA (16 μl). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 7 h. La concentración y la purificación con una unidad COMBIFLASH™ usando un 30 % de MeOH en DCM como eluyente produjeron el compuesto **36** (29 % de rendimiento). El compuesto **36** se trató con 20% de piperidina en DMF (2 ml). Después de la agitación a TA durante 15 min, la LCMS mostró que la reacción se completó. La piperidina se retiró en un evaporador giratorio. La mezcla de reacción se absorbió sobre gel de sílice y se purificó con una unidad COMBIFLASH™ usando un 30 % de metanol en DCM como eluyente para proporcionar el producto **37** (60 % de rendimiento). El producto **37** se acopló con éster de N-hidroxisuccinimida **33** (6 mg) en DIPEA (16 μl) en DMSO (1 ml) a TA durante 3 h. La purificación mediante R-HPLC proporcionó el producto **38** (1,56 mg). LC MS (m+1 = 876).

**Compuesto 39.** A una solución de los compuestos **17** (1,68 mg) y **33** (2 mg, 22 μmol) en DMF (0,5 ml), se añadió DIPEA (5 μl). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La purificación mediante R-HPLC proporcionó el producto **39** (0,776 mg). LC MS (m+1= 777).

#### *Ejemplo 9 - Adaptación del compuesto (Ilc) para la conjugación*

La **Figura 9** muestra esquemas de reacción para adaptar el compuesto (Ilc) para la conjugación.

**Compuesto 40.** Una solución del compuesto **22** (4,89 mg, 8 μmol), compuesto **31** (5,68 mg, 8,00 μmol) y DIPEA (6,95 μl, 40,0 μmol) en DMSO (3 ml) se agitó a TA durante 1 h. La purificación mediante R-HPLC y la liofilización proporcionaron 4,6 mg del compuesto **40** deseado (54 % de rendimiento). LC MS (m/2+1 = 535). NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13,07 (s, 1H), 9,87 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 8,01 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,91 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,77 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,2 (m, 5H), 6,95 (m, 3H), 5,92 (dd, J = 30, 9,2 Hz, 2H), 5,35 (m, 2H), 5,08 (s, 1H), 4,08 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 3,31 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 2,93 (m, 2H), 2,09 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,63 (m, 2H), 1,29 (d, J = 6,4 Hz, 3H), 0,78 (m, 6H).

**Compuesto 41.** A una solución del compuesto **22** (4,89 mg, 8 μmol) en DMSO (3 ml), se añadieron DIPEA (4,35 μl, 25,00 μmol) y el compuesto **33a** (TCI, 2,466 mg, 8,00 μmol). La mezcla de reacción se agitó a TA. Después de 30 min, se añadieron otros 0,5 equiv. del compuesto **33a** y DIPEA (5 equiv.), y la agitación se continuó durante 30 min. La HPLC y LCMS mostraron que la reacción se completó. La purificación mediante R-HPLC y la liofilización produjeron 2,35 mg del compuesto **41** (43 % de rendimiento). LC MS (m+1 = 691,3). NMR <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 13,07 (s, 1H), 9,87 (m, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,89 (m, 2H), 7,1 - 7,5 (m, 2H), 6,7-7,0 (m, 4 H), 6,4- 6,6 (m, 2 H), 5,92 (dd, J = 30,4, 10,0 Hz, 2H), 5,28 (m, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,91 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 1,98 (m, 4H), 1,40 (m, 2H), 1,24 (d, J = 6,0 Hz, 3H), 1,0 - 1,2 (m, 4H).

#### *Ejemplo 10 - Adaptación del compuesto (Ild) para la conjugación*

La **Figura 10** muestra un esquema de reacción para adaptar el compuesto (Ild) (etiquetado como **30**) para la conjugación.

**Compuesto 43.** Se añadió DIPEA (0,012 ml, 68,3 μmol) a una solución del compuesto **30** (6,53 mg, 11,39 μmol), citrulina protegida con Fmoc **42** (Chem-Impex, 9,05 mg, 22,77 μmol) y hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU, 8,66 mg, 22,77 μmol) en DMF (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 h y se elaboró con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. La purificación mediante cromatografía COMBIFLASH™ en una columna de sílice de 12 g usando un 12 % de MeOH en DCM como eluyente proporcionó el producto **43** (29 % de rendimiento). LCMS [[M+1] = 953.

**Compuesto 44.** A una solución del compuesto **43** (4 mg, 4,20 μmol) en DMF (0,8 ml), se añadió piperidina (200 μl, 2,020 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 15 min, la LCMS mostró que la reacción se completó. La piperidina se retiró mediante evaporación giratoria. La mezcla de reacción se absorbió en gel de sílice

y se purificó mediante cromatografía COMBIFLASH™ con un gradiente de 25-65 % MeOH/DCM como eluyente para obtener el compuesto **44** (80 % de rendimiento). LCMS [M+1] = 731.

5 *Compuesto de maleimido 45.* Se añadió EDC (2 equiv.) a una solución de t-butanol (1 equiv.), t-butil valina (1,05 equiv.) y maleimida (2,11 g, 1,0 equiv.) en DCM (50 ml) a temperatura ambiente. Después de 1 h, la mezcla se recuperó en EtOAc, la cual se lavó con ácido cítrico acuoso, bicarbonato de sodio acuoso y salmuera. La fase orgánica se secó y se concentró mediante evaporación para retirar el solvente. El residuo se hizo pasar a través de una columna (gradiente de EtOAc/hexano 0-80%) para obtener 3,02 g de un aceite. Este aceite se disolvió en DCM-TFA (3:2; 20 ml) a temperatura ambiente. Después de 4 h, la solución se evaporó y se secó en alto vacío durante la noche para obtener el compuesto **45** como un sólido blanco (2,1 g, 68 % de rendimiento). LCMS: (M+1) = 311.

10 *Compuesto 46.* A una solución del compuesto de maleimido **45** (3,12 mg, 10,06 µmol) y el compuesto **44** (2,45 mg, 3,35 µmol) en DMF (1 ml), se añadió HATU (4,59 mg, 0,012 mmol) y luego DIPEA (5,26 µl, 0,030 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 17 h. La purificación mediante R-HPLC proporcionó el producto **46** (0,455 mg, 13 % de rendimiento). LCMS (m+1 = 1023)

#### Ejemplo 11 - Conjugación con un anticuerpo antimesotelina

20 Este ejemplo describe la conjugación de los compuestos (IVe) (etiquetado como **41**) en la **Figura 9** y (IVf) (etiquetado como **40** en la **Figura 9**) con un anticuerpo antimesotelina.

25 El anticuerpo antimesotelina monoclonal 6A4 (Terrett et al., documento WO 2009/045957 A1), a una concentración de 5,3 mg/ml en 100 mM de fosfato de sodio, NaCl 150 mM, pH 8,0, se tioló con un exceso molar de 10 veces de 2-iminotiolano. La reacción de tiolación se dejó proceder durante 1 hora a TA con agitación continua.

30 Después de la tiolación, al anticuerpo 6A4 se le cambió el tampón por un tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, pH 7,0) mediante una columna PD10 (Sephadex G-25). La concentración del anticuerpo tiolado se determinó mediante espectroscopia UV a 280 nm. La concentración de tiol se midió usando el ensayo de ditiodipiridina.

35 Se añadió una solución madre 2 mM del compuesto (IVe) o (IVf), según el caso, en DMSO a un exceso molar de 1,5 veces por grupo tiol en el anticuerpo 6A4. Se añadió DMSO para lograr una concentración final del 20 % y luego TWEEN-80™ a una concentración final del 0,1 %. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a TA. Después de esta etapa de conjugación, se añadió N-etilmaleimida 100 mM (NEM) en DMSO a un exceso molar de 10 veces sobre grupos tiol en el anticuerpo 6A4 para inactivar cualquier grupo tiol sin reaccionar. La reacción de inactivación se dejó proceder durante una hora a temperatura ambiente con agitación continua.

40 El anticuerpo conjugado 6A4 se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y luego se sometió a purificación cromatográfica de intercambio catiónico (CEX). Una columna SP Sepharose High Performance CEX se regeneró con 5 volúmenes de columnas (CV) de HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 M, tampón pH 7,0. Después de la regeneración, la columna se equilibró con 3 CV de tampón de equilibrio (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, pH 7,0). El conjugado de anticuerpo 6A4 con el compuesto (IVe) o (IVf), según el caso, se cargó en la columna, y la columna se lavó una vez con el tampón de equilibrio. El conjugado se eluyó con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 110 mM, pH 7,0. El eluido se recolectó en fracciones. Luego, la columna se regeneró con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0, para retirar los añadidos de proteína y cualquier compuesto (IVe) o (IVf) sin reaccionar.

Las fracciones de eluido que contenían conjugado de anticuerpo monomérico se agruparon. Las relaciones de sustitución y concentración del conjugado de anticuerpos se determinaron midiendo la absorbancia a 280 y 560 nm.

50 Al agrupamiento del eluido de CEX del conjugado se le cambió el tampón por HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 100 mM, 0,01 % de TWEEN 80™, pH 7,0, mediante diálisis usando una membrana 10 MWCO. Las relaciones de sustitución y concentración del conjugado de anticuerpos posteriores a la diálisis se determinaron midiendo la absorbancia a 280 y 560 nm. Las características de los conjugados obtenidos se resumen en la Tabla 1, a continuación:

55

Tabla 1 – Conjugación con anticuerpo antimesotelina 6A4					
Conjugado	Concentración (mg/ml)	Relación de sustitución	Agregación (%)	Cantidad total (mg)	Rendimiento (%)
6A4-Cpd (IVe)	1,51	1,0	11,0	7,55	73
6A4-Cpd (IVf)	1,23	1,2	12,0	6,15	58

*Ejemplo 12 - Conjugación con un anticuerpo anti-CD70*

Este ejemplo describe la conjugación de los compuestos (IVe) y (IVf) con un anticuerpo anti-CD70.

- 5 El anticuerpo anti-CD70 monoclonal 2H5 (Terrett et al., documento US 2009/0028872 A1), a una concentración de 5,5 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 50 mM, 0,02 % de TWEEN-80™, pH 7,5, se tioló con un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano. La reacción de tiolación continuó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua.
- 10 Después de la tiolación, al anticuerpo 2H5 se le cambió el tampón por un tampón de conjugación (50 mM HEPES, glicina 5 mM, pH 7,0) mediante una columna PD10 (Sephadex G-25). La concentración del anticuerpo tiolado se determinó mediante espectroscopía UV a 280 nm. La concentración de tiol se midió usando el ensayo de ditiopiridina.
- 15 Se añadió una solución madre 2 mM del compuesto (IVe) o (IVf), según el caso, en DMSO a un exceso molar de 1,5 veces por grupo tiol en el anticuerpo 2H5. Se añadió DMSO para lograr una concentración final del 20 % y TWEEN-80™ hasta una concentración final del 0,1 %. El medio de reacción se agitó durante 2 h a TA. Después de esta etapa de conjugación, se añadió NEM 100 mM en DMSO a un exceso molar de 10 veces en grupos tiol en el anticuerpo 6A4 para inactivar cualquier grupo tiol sin reaccionar. La reacción de inactivación se dejó proceder
- 20 durante 1 h a temperatura ambiente con agitación continua.

El anticuerpo conjugado 2H5 se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y luego se sometió a purificación cromatográfica CEX. Una columna SP Sepharose High Performance CEX se regeneró con 5 CV de HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 M, tampón pH 7,0. Después de la regeneración, la columna se equilibró con 3 CV de tampón de equilibrio (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, pH 7,0). El conjugado de anticuerpo 2H5 con el compuesto (IVe) o (IVf), según el

25 caso, se cargó en la columna, y la columna se lavó una vez con el tampón de equilibrio. El conjugado se eluyó con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 110 mM, pH 7,0. El eluido se recolectó en fracciones. Luego, la columna se regeneró con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 M, pH 7,0, para retirar los añadidos proteicos y cualquier compuesto (IVe) o (IVf) sin reaccionar.

30

Las fracciones que contenían conjugado se agruparon, se les intercambiaron el tampón y se dializaron, como se describió en el ejemplo anterior. Las características del conjugado obtenido se resumen en la Tabla 2.

Conjugado	Concentración (mg/ml)	Relación de sustitución	Agregación (%)	Cantidad total (mg)	Rendimiento (%)
2H5-Cpd (IVe)	0,87	1,38	8,1	6,52	59
2H5-Cpd (IVf)	1,14	4,8	9,5	8,55	77

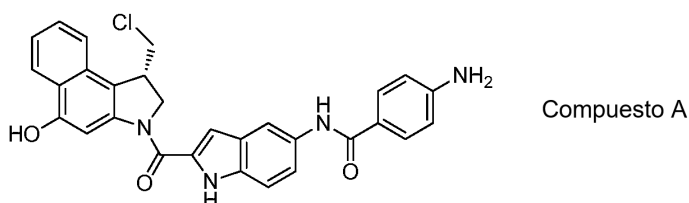
*Ejemplo 13 - Actividad biológica de los compuestos*

La actividad antiproliferativa de los compuestos de la presente invención o sus conjugados se analizó de la siguiente manera. Las líneas celulares de tumores humanos se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EE.UU., y se cultivaron de acuerdo con la instrucción de ATCC. Las células se sembraron a  $1,0 \times 10^3$  o  $1,0 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 h para los ensayos DE ATP o ensayos de  $^3\text{H}$  timidina, respectivamente. A los pocillos se añadieron diluciones en serie 1:3 de compuestos libres (no conjugados) o sus conjugados. Las placas se incubaron durante 24 a 72 h. Las placas de  $^3\text{H}$  timidina se pulsaron con  $1,0 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina por pocillo durante las últimas 24 horas del período de incubación total, se recolectaron y se leyeron en un contador de escintilación Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los niveles de ATP en las

40 placas de ATP se midieron usando el kit de viabilidad celular por luminiscencia CELLTITER-GLO® de acuerdo con el manual del fabricante y se leyeron en un luminómetro GLOMAX® 20/20 (ambos de Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los valores  $\text{EC}_{50}$  - la concentración en la cual un agente inhibe o reduce la proliferación celular en un 50 % - se determinaron mediante el software PRISM™, versión 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.).

45

50 La **Figura 11a** es una gráfica de la actividad antiproliferativa del compuesto (IIa) contra las células de leucemia HL-60, según se midió con el ensayo ATP usando un período de incubación de 72 h, en comparación con tres compuestos de referencia: doxorubicina (adriamicina), uncialamicina y compuesto A, el cual es un agente de alquilación de ADN con la siguiente estructura:



Los valores de  $EC_{50}$  derivados de la **Figura 11a** se muestran en la Tabla 3. La potencia del compuesto (IIa) fue mayor que la de uncialamicina.

5

	Doxorrubicina	Uncialamicina	Compuesto (IIa)	Compuesto A
$EC_{50}$ (nM)	5,979	0,01199	0,00404	0,001872

La **Figura 11b** es una gráfica análoga de la actividad antiproliferativa contra la línea celular de cáncer de ovarios resistente a doxorrubicina (Adr), también mediante el ensayo ATP y un período de incubación de 72 h. Los valores de  $EC_{50}$  correspondientes se muestran en la Tabla 4. La potencia del compuesto (IIa) - nuevamente, incluso mayor que la de uncialamicina - es considerable si se tiene en cuenta la pérdida de potencia de doxorrubicina y compuesto A cuando se enfrentan a una línea celular resistente.

10

	Doxorrubicina	Uncialamicina	Compuesto (IIa)	Compuesto A
$EC_{50}$ (nM)	3846	0,08502	0,06118	0,1432

La Tabla 5 muestra datos antiproliferativos adicionales del compuesto (IIa), en comparación con otras dos toxinas que se usaron en los conjugados: Compuesto A y doxorrubicina. El método de ensayo fue el método ATP. Las líneas de células cancerosas que se evaluaron fueron A2780 (ovarios), A549 (pulmonar), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda), COLO205 (colon), DU4475 (mama), H2087 (pulmonar de células no microcíticas), H661 (pulmonar de células grandes), HCT116 (colon), LNCaP (próstata), LS174T (colon), MDA MB468 (mama), MDA MB231 (mama) y SET2 (de leucemia). Los efectos antiproliferativos se informan como  $IC_{50}$ , es decir, la concentración de toxina que produce un efecto inhibitor del 50 %.

15

20

Línea celular	$IC_{50}$ (nM)		
	Compuesto A	Doxorrubicina	Compuesto (IIa)
A2790	0,004	11,2	0,003
A549	0,04	138,5	0,076
CCRF-CEM	0,019	19,4	0,014
COLO205	0,019	19,7	0,01
DU4475	0,001	2,9	0,002
H2087	0,019	54,4	0,037
H661	0,02	26,6	0,053
HCT116	0,002	23,4	0,007
LNCaP	0,01	5,5	0,001
LS174T	0,015	11,1	0,002
MDA MB468	0,009	29	0,012
MCD MB231	0,068	90,5	0,085
SET2	0,002	67,6	0,008

La **Figura 12a** muestra datos antiproliferativos adicionales, para los compuestos (IIa), (IIc), (IIe) y (IIe), con doxorrubicina como compuesto comparativo, contra las células de cáncer renal 786-O. Los valores de  $EC_{50}$  derivados de la **Figura 12a** se proporcionan en la Tabla 6. Se utilizó el ensayo ATP, con un período de incubación de 72 h.

25

	Doxorrubicina	Comp. (IIa)	Comp. (IIc)	Comp. (IIe)	Comp. (IIe)
EC <sub>50</sub> (nM)	92,31	0,1160	1,275	0,05803	1,716

La **Figura 12b** es una gráfica antiproliferativa similar, pero contra células de cáncer pulmonar H226. Los valores de EC<sub>50</sub> derivados se proporcionan en la Tabla 7. Se utilizó el ensayo ATP, con un período de incubación de 72 h.

5

	Doxorrubicina	Comp. (IIa)	Comp. (IIc)	Comp. (IIe)	Comp. (IIe)
EC <sub>50</sub> (nM)	141,2	1,001	0,9859	0,8729	17,45

#### Ejemplo 14 - Actividad biológica de los conjugados

Usando los mismos métodos de ensayo descritos anteriormente, se midió la actividad antiproliferativa de los conjugados preparados de los compuestos de la presente invención.

10

La **Figura 13a** muestra la actividad antiproliferativa contra las células 786-O usando el ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H timidina (72 h de incubación) de cuatro conjugados preparados de los compuestos de la presente invención: (a) un conjugado del anticuerpo 2H5 (anti-CD70, Terrett et al., documento US 2009/0028872 A1) con el compuesto (IVf); (b) un conjugado de anticuerpo 6A4 (antimesotelina, Terrett et al., documento WO 2009/045957 A1) con el compuesto (IVf); (c) un conjugado del anticuerpo 2H5 con el compuesto (IVe); y (d) un conjugado del anticuerpo 6A4 con el compuesto (IVe). En la **Figura 13a** (y también en las **Figuras 13b** y **13c** posteriores), los valores del eje X para "Concentración de toxina" se ajustan para la relación de sustitución (SR), es decir, los valores son iguales a la concentración molar del conjugado x SR. Los valores EC<sub>50</sub> derivados de las representaciones gráficas en la **Figura 13a** se proporcionan en la Tabla 8.

15  
20

	2H5-(IVf)	6A4-(IVf)	2H5-(IVe)	6A4-(IVe)
EC <sub>50</sub> (nM)	0,7629	33,37	19,68	27,43

La **Figura 13b** muestra la actividad antiproliferativa de los mismos cuatro conjugados contra las células H226, usando nuevamente el ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H timidina y un período de incubación de 72 h. Los valores de EC<sub>50</sub> derivados se muestran en la Tabla 9.

25

	2H5-(IVf)	6A4-(IVf)	2H5-(IVe)	6A4-(IVe)
EC <sub>50</sub> (nM)	12,37	0,8822	28,24	39,60

La **Figura 13c** es otra gráfica de la actividad antiproliferativa de los conjugados 2H5-(IVf) y 6A4-(IVf) contra las células H226, pero se mide usando el ensayo ATP, con un período de incubación de 72 h. Los valores de EC<sub>50</sub> derivados fueron 6,630 y 0,1548 nM, respectivamente.

30

La descripción detallada anterior de la invención incluye pasajes que se relacionan principal o exclusivamente con partes o aspectos particulares de la invención. Debe tenerse en cuenta que esto se realiza para una mayor claridad y conveniencia, que una característica particular puede ser relevante en más de un solo pasaje en el cual se describe y que la descripción de la presente incluye todas las combinaciones adecuadas de la información que se encuentra en los diferentes pasajes. De manera similar, si bien las distintas figuras y descripciones de la presente se relacionan con realizaciones específicas de la invención, debe tenerse en cuenta que cuando se describe una característica específica en el contexto de una figura o realización particulares, la figura también puede usarse, con el alcance adecuado, en el contexto de otra figura o realización, en combinación con otra figura o en la invención en general.

35  
40

Además, aunque la presente invención se ha descrito particularmente en términos de ciertas realizaciones preferidas, la invención no se limita a esas realizaciones preferidas. En cambio, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

45

#### REFERENCIAS

A continuación se proporcionan las citas completas de las siguientes referencias citadas anteriormente de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha, en esta descripción. Cada una de estas referencias se incorpora



en el presente documento como referencia para todos los fines.

Davies et al., *Org. Lett.* 2005, 7 (23), 5233-5236.

Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007).

5 Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 855-69.

Nicolaou et al., *Ang. Chem.* 2007, 119, 4788-4791 [2007a].

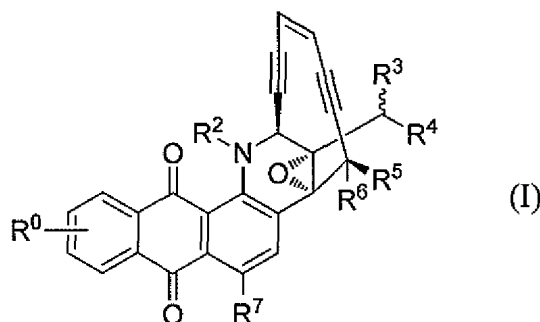
Nicolaou et al., *Ang. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 4704-4707 [2007b].

Nicolaou et al., *Ang. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 185-189.

10 Shao, *Curr. Mol. Pharmacology* 2008, 1, 50-60.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I),



5

en la que

10  $R^0$  es  $NHR^{1a}$ ,  $NHC(=O)OR^{1b}$ ,  $NHC(=O)NHR^{1b}$ ,  $OC(=O)NHR^{1b}$ ,  $(CH_2)_{1-4}NHR^{1a}$ , F, Cl, Br,  $OR^{1a}$  o  $SR^{1b}$ ;  
 $R^{1a}$  es H, alquilo  $C_1-C_6$ ,  $(CH_2)_nNH_2$ ,  $C(=O)(CH_2)_nNH_2$ ,  $C(=O)CHR^8NH_2$  o  $C(=O)R^9NH_2$ ;  
 $R^{1b}$  es H, alquilo  $C_1-C_6$ ,  $(CH_2)_nNH_2$ ;



15  $R^2$  es H,  $R^{10}$ ,  $C(=O)R^{10}$  o  $C(=O)OR^{10}$ ;  
 $R^3$  es H o alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido;  
 $R^4$  es OH, SH,  $NH_2$ ,  $OR^{10}$ ,  $SR^{10}$ ,  $NHR^{10}$ ,  $N(R^{10})_2$ ,  $NHC(=O)OR^{10}$ ,  $OC(=O)NHR^{1b}$ ,  $OC(=O)R^{10}$ ,  $SC(=O)R^{10}$  o  $NHC(=O)R^{10}$ ;  
 $R^5$  es OH, SH,  $NH_2$ ,  $OR^{10}$ ,  $SR^{10}$ ,  $NHR^{10}$ ,  $N(R^{10})_2$ ,  $NHC(=O)OR^{10}$ ,  $OC(=O)NHR^{1b}$ ,  $OC(=O)R^{10}$ ,  $SC(=O)R^{10}$  o  $NHC(=O)R^{10}$ ;  
 $R^6$  es H o alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido; o  $R^5$  y  $R^6$  se combinan para formar =O;  
 $R^7$  es OH, SH,  $NH_2$ ,  $OR^{10}$ ,  $SR^{10}$ ,  $NHR^{10}$ ,  $N(R^{10})_2$ ,  $NHC(=O)OR^{10}$ ,  $OC(=O)NHR^{1b}$ ,  $OC(=O)R^{10}$ ,  $SC(=O)R^{10}$  o  $NHC(=O)R^{10}$ ;

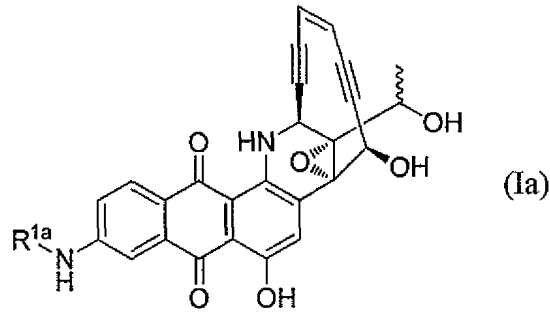
25  $R^8$  es el resto de la cadena lateral de un  $\alpha$ -aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

30  $R^9$  es arileno sustituido o no sustituido, heteroarileno sustituido o no sustituido, alquilarileno sustituido o no sustituido, cicloalquileo sustituido o no sustituido o heterocicloalquileo sustituido o no sustituido;  
 cada  $R^{10}$  es independientemente alquilo  $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido;

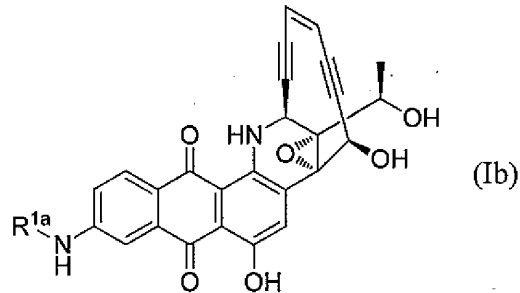
35 en donde los sustituyentes de los restos sustituidos se eligen independientemente entre sí de alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>; y n es 2, 3, 4, 5 o 6;

45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ia):

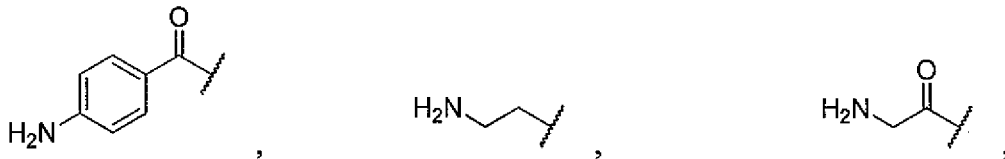


3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la fórmula (Ib):

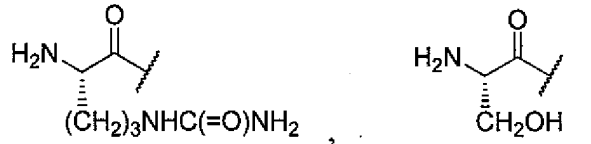


5

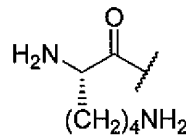
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que R<sup>1a</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me,



10



y



15

5. Un conjugado, que tiene una estructura representada por la fórmula (III)

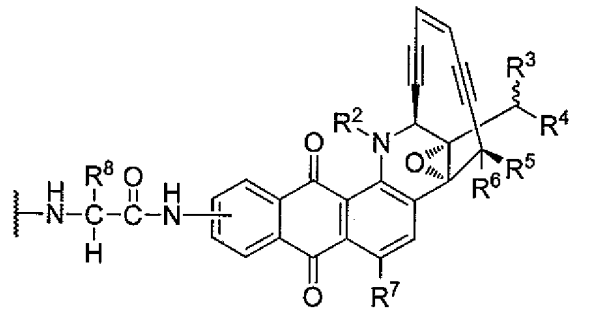
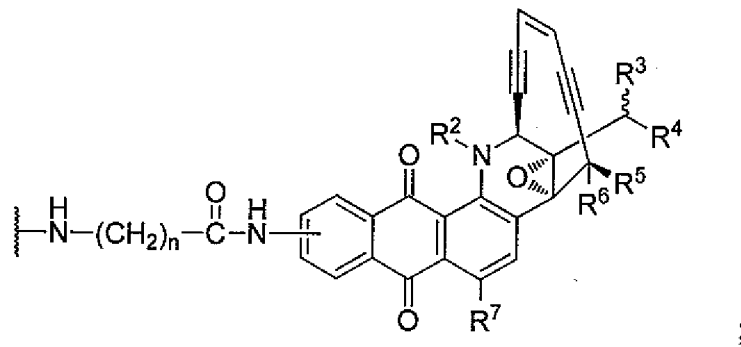
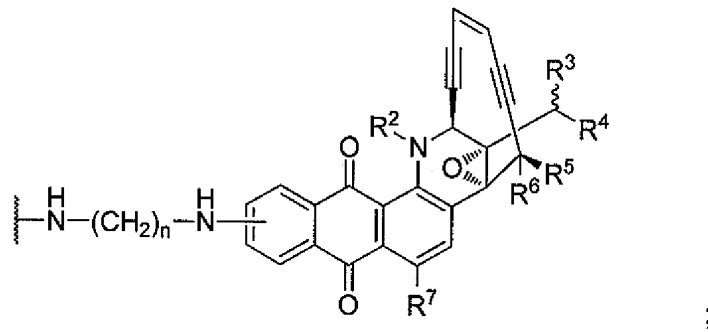
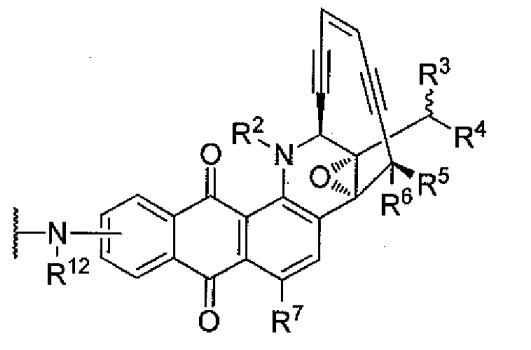
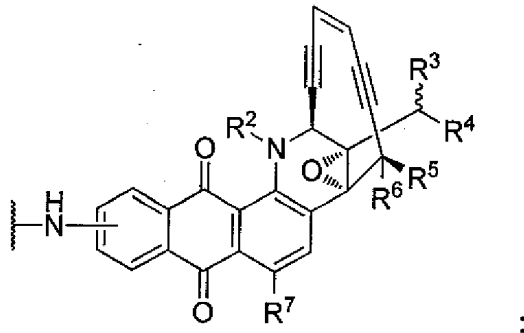


20

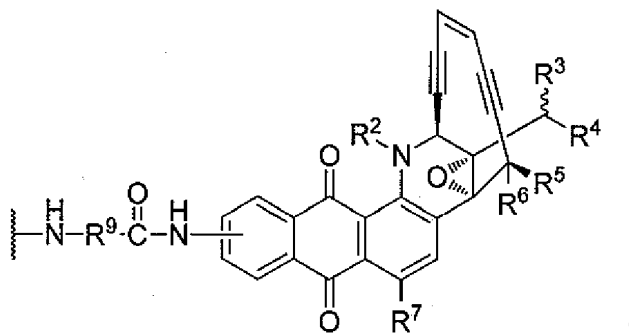
en la que

- Z es un resto que marca como diana;
- X<sup>D</sup> es un primer resto espaciador;
- X<sup>Z</sup> es un segundo resto espaciador;
- C es un grupo escindible;
- los subíndices a y b son independientemente 0 o 1;
- el subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y
- D se selecciona del grupo que consiste en

30



o



5 en donde

R<sup>2</sup> es H, R<sup>10</sup>, C(=O)R<sup>10</sup> o C(=O)OR<sup>10</sup>;

R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido;

10 R<sup>4</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>5</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>6</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido; o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se combinan para formar =O;

15 R<sup>7</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>8</sup> es el resto de la cadena lateral de un α-aminoácido, seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

20 R<sup>9</sup> es arileno sustituido o no sustituido, heteroarileno sustituido o no sustituido, alquilarileno sustituido o no sustituido, cicloalquileo sustituido o no sustituido o heterocicloalquileo sustituido o no sustituido;

cada R<sup>10</sup> es independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido;

25 R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

en donde los sustituyentes de los restos sustituidos se eligen independientemente entre sí de alquilo, alquenilo, alquínilo, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>; y

35

n es 2, 3, 4, 5 o 6.

6. Una composición que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IV)

40



en la que

45 R<sup>31</sup> es un grupo funcional reactivo;

X<sup>D</sup> es un primer resto espaciador;

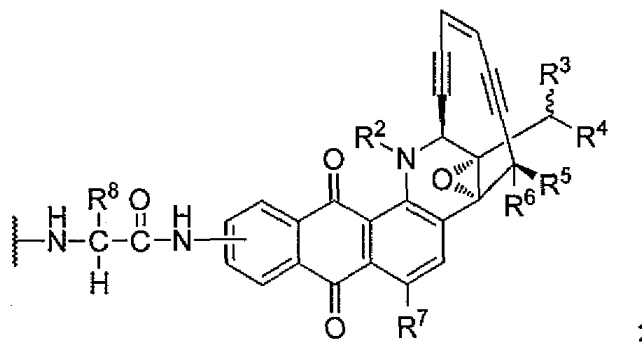
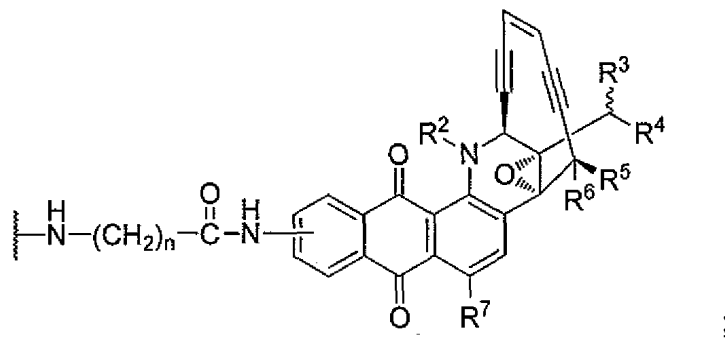
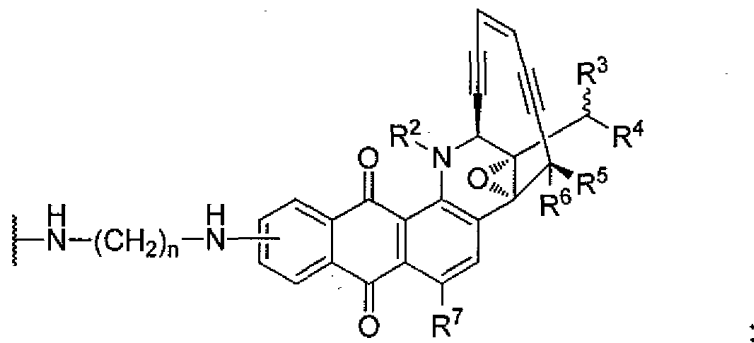
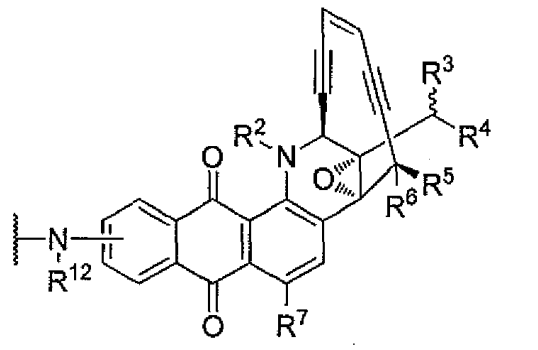
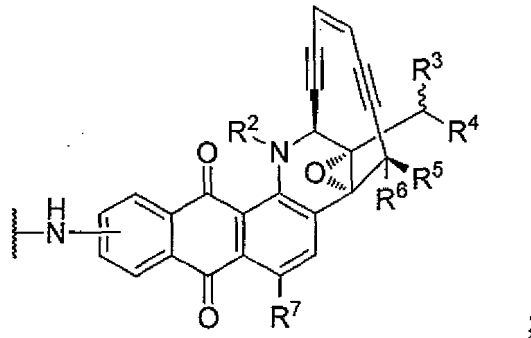
X<sup>Z</sup> es un segundo resto espaciador;

C es un grupo escindible;

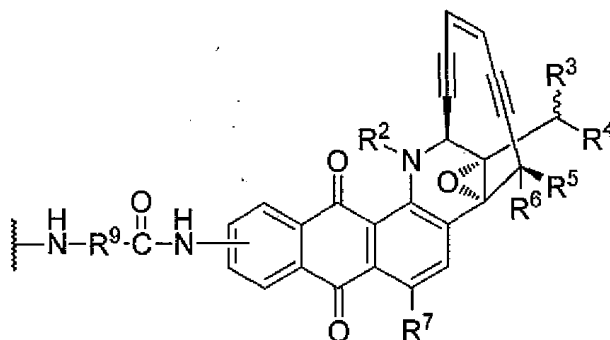
los subíndices a y b son independientemente 0 o 1;

50 el subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10; y

D se selecciona del grupo que consiste en



o



;

5 en donde

R<sup>2</sup> es H, R<sup>10</sup>, C(=O)R<sup>10</sup> o C(=O)OR<sup>10</sup>;

R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido;

10 R<sup>4</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>5</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>6</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido; o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se combinan para formar =O;

15 R<sup>7</sup> es OH, SH, NH<sub>2</sub>, OR<sup>10</sup>, SR<sup>10</sup>, NHR<sup>10</sup>, N(R<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)OR<sup>10</sup>, OC(=O)NHR<sup>1b</sup>, OC(=O)R<sup>10</sup>, SC(=O)R<sup>10</sup> o NHC(=O)R<sup>10</sup>;

R<sup>8</sup> es el resto de la cadena lateral de un α-aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;

20 R<sup>9</sup> es arileno sustituido o no sustituido, heteroarileno sustituido o no sustituido, alquilarileno sustituido o no sustituido, cicloalquileo sustituido o no sustituido o heterocicloalquileo sustituido o no sustituido;

cada R<sup>10</sup> es independientemente alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido o heteroarilo sustituido o no sustituido;

25 R<sup>12</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

en donde los sustituyentes de los restos sustituidos se eligen independientemente entre sí de alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifático, heterocicloalifático, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, azido, -NH<sub>2</sub>, -NH(alquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH<sub>2</sub>, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)<sub>2</sub>, -NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO<sub>2</sub>(alquilo), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo) y -SO<sub>2</sub>N(alquilo)<sub>2</sub>; y

35

n es 2, 3, 4, 5 o 6.

40 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que R<sup>31</sup> es -NH<sub>2</sub>, -OH, -CO<sub>2</sub>H, -SH, maleimido, ciclooctino, azido, hidroxilamino o N-hidroxisuccinimido.

8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5 para usar en un método para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer.

45 9. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en un método para el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 8, conjugándose el compuesto con un resto que marca como diana que es un anticuerpo.

50 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar en un método para el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 9, uniéndose el anticuerpo a un antígeno que se sobreexpresa o se expresa únicamente en el cáncer.

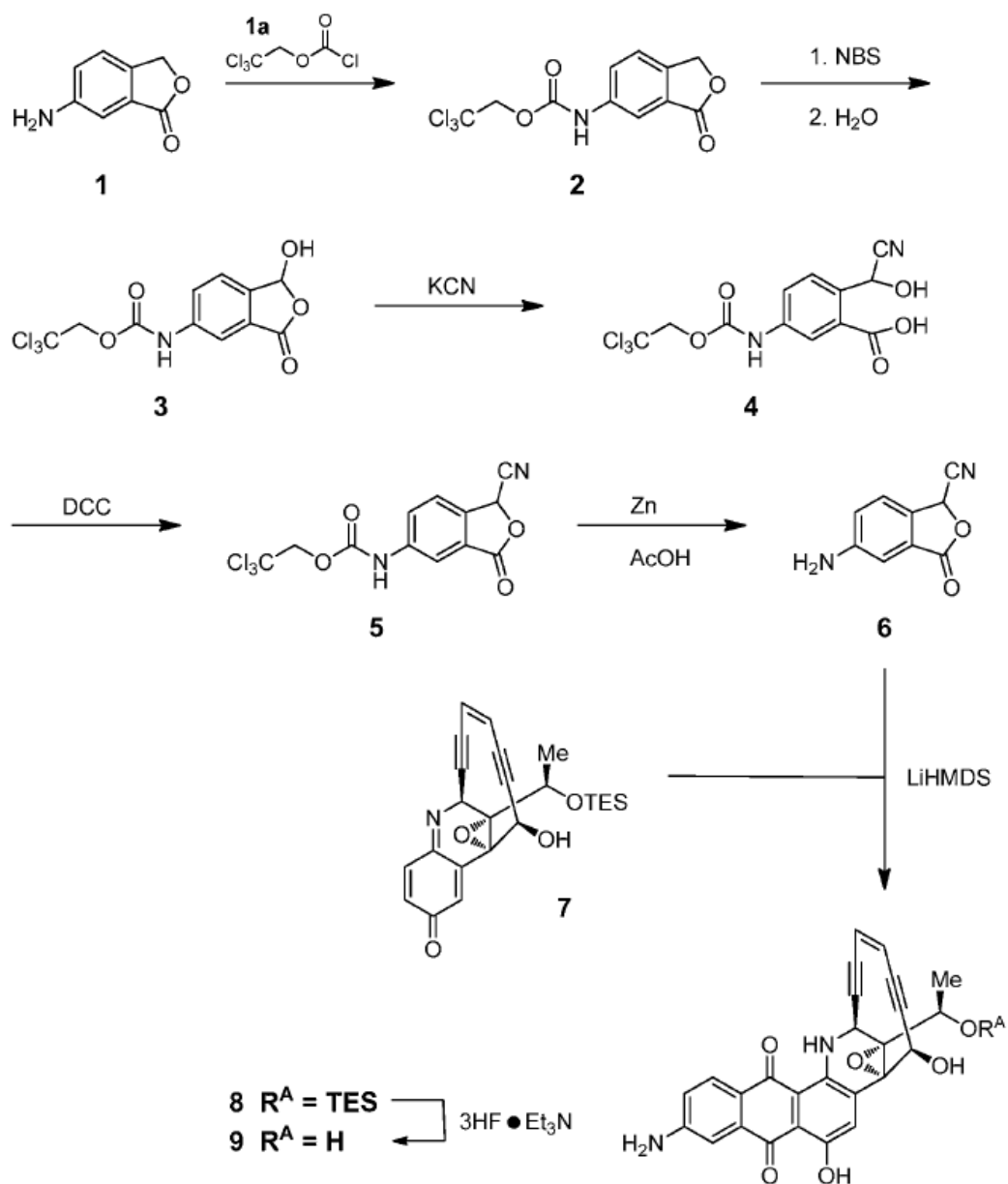
11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5 para usar en un método para el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 8,

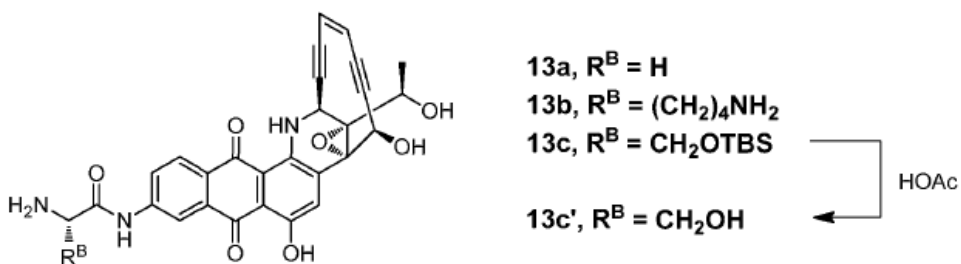
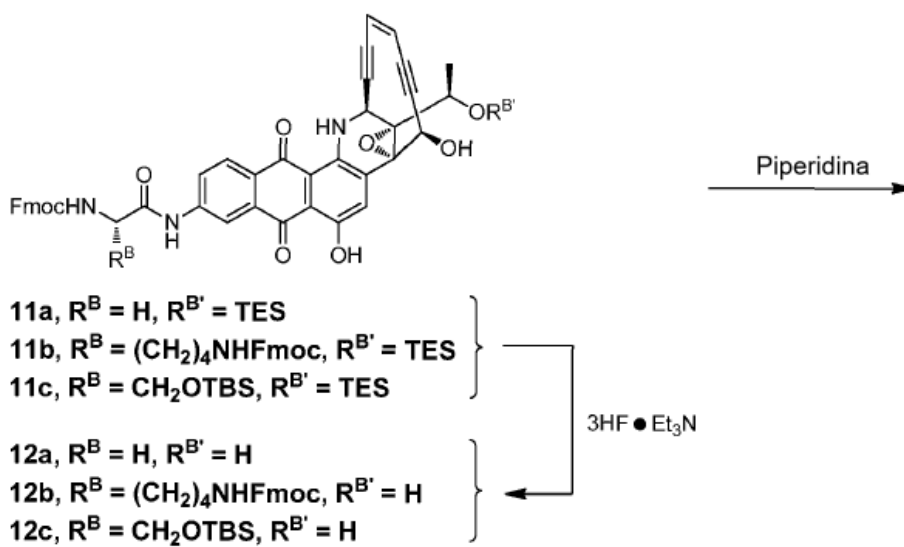
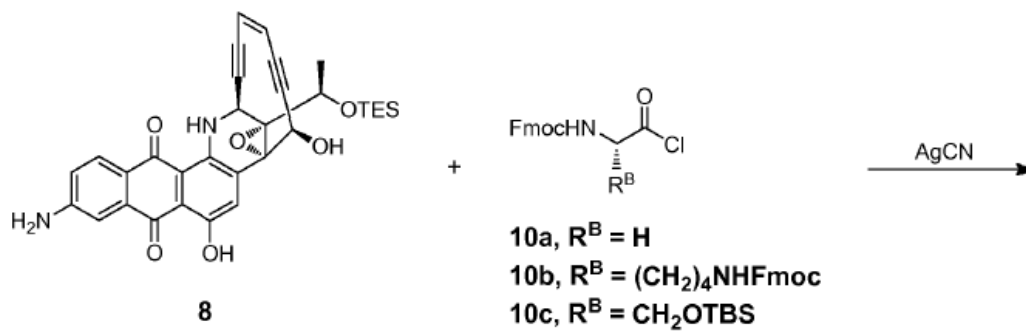
seleccionándose el cáncer del grupo que consiste en leucemia, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

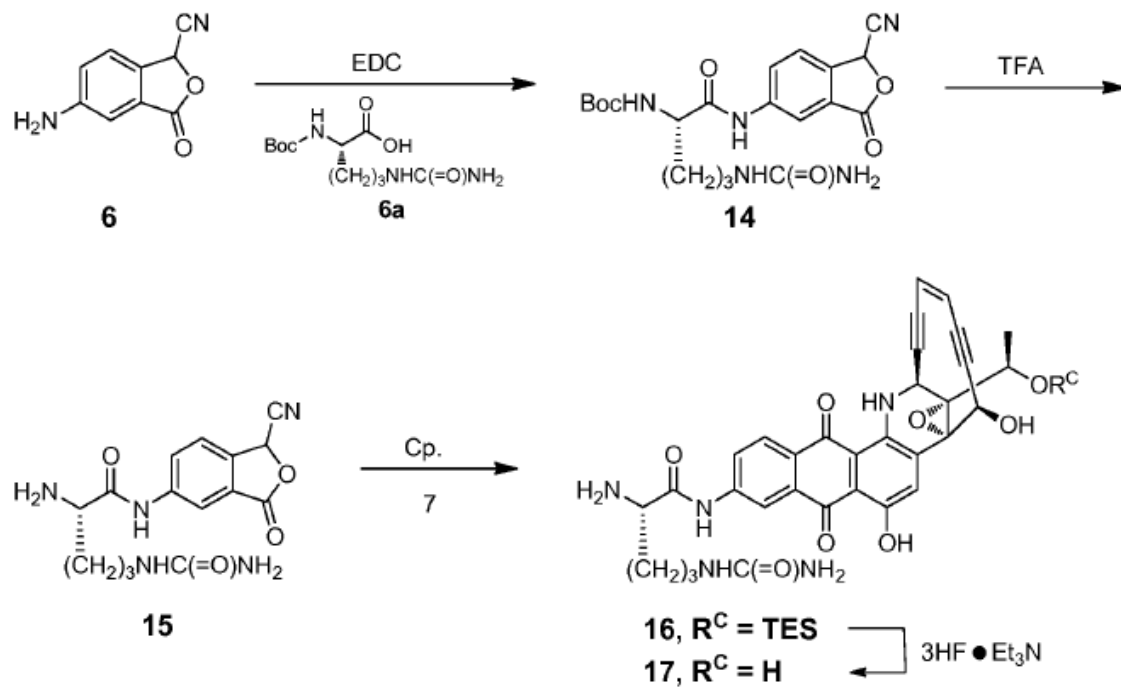
5 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

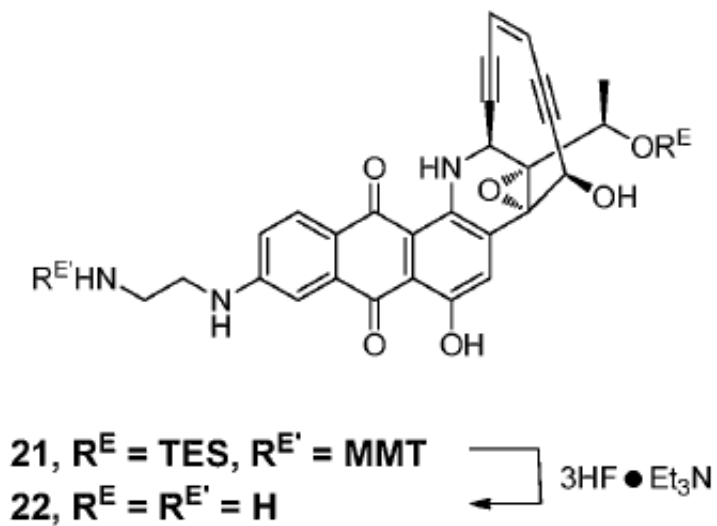
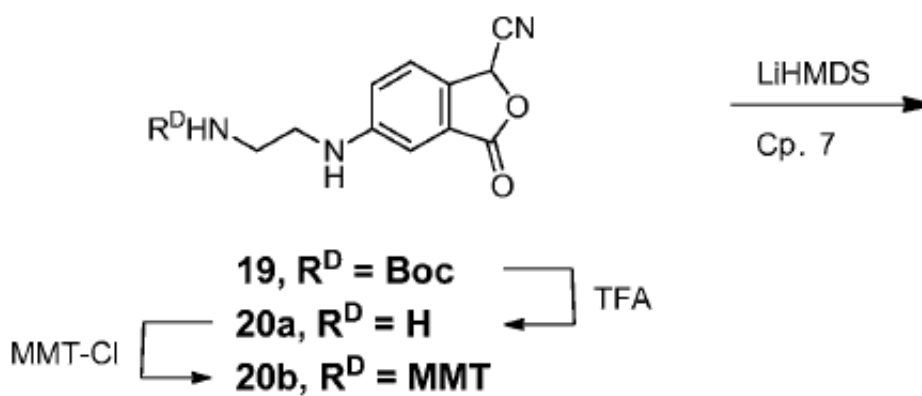
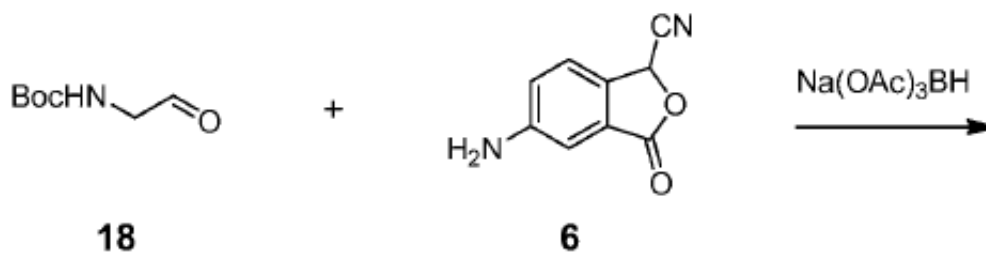
13. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

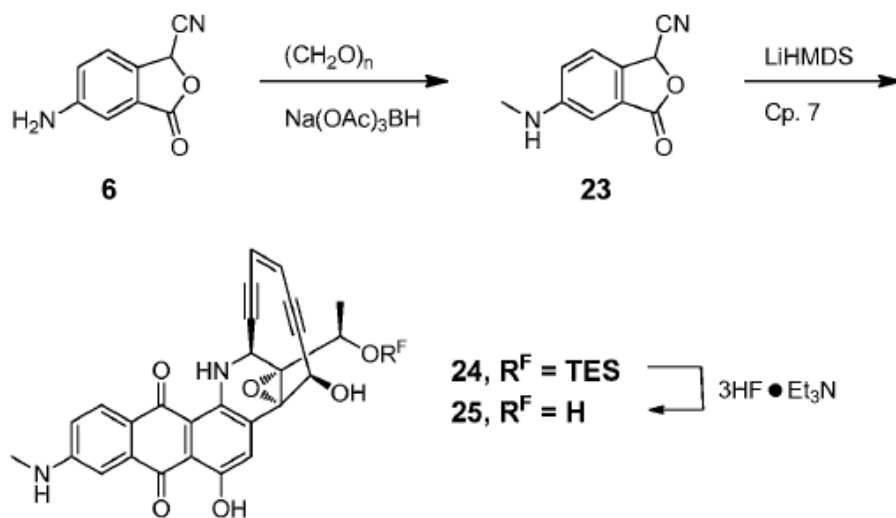
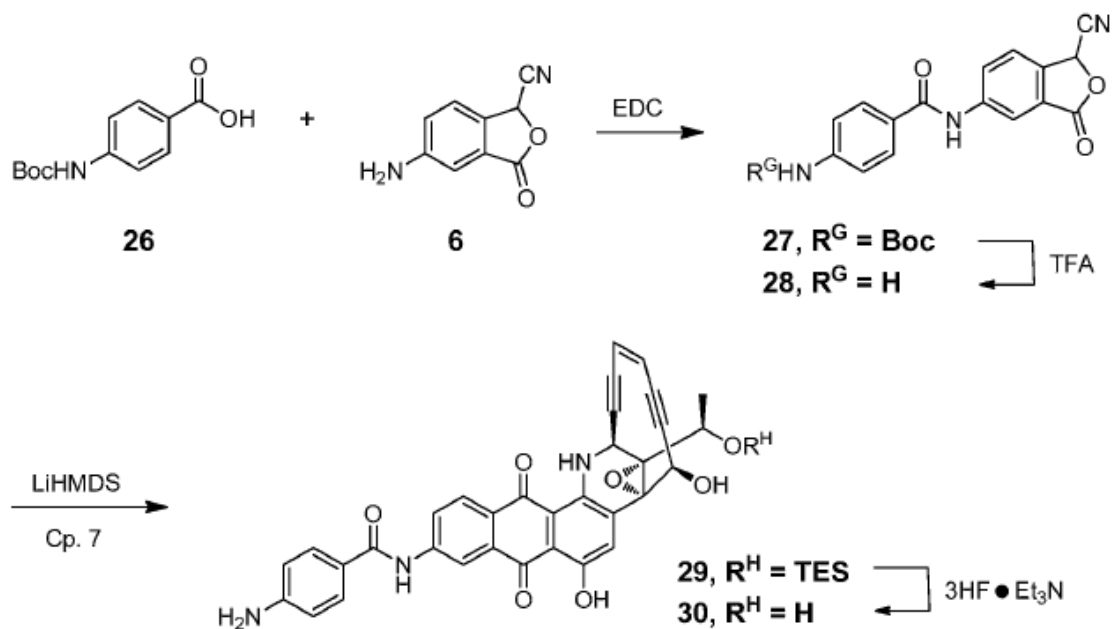


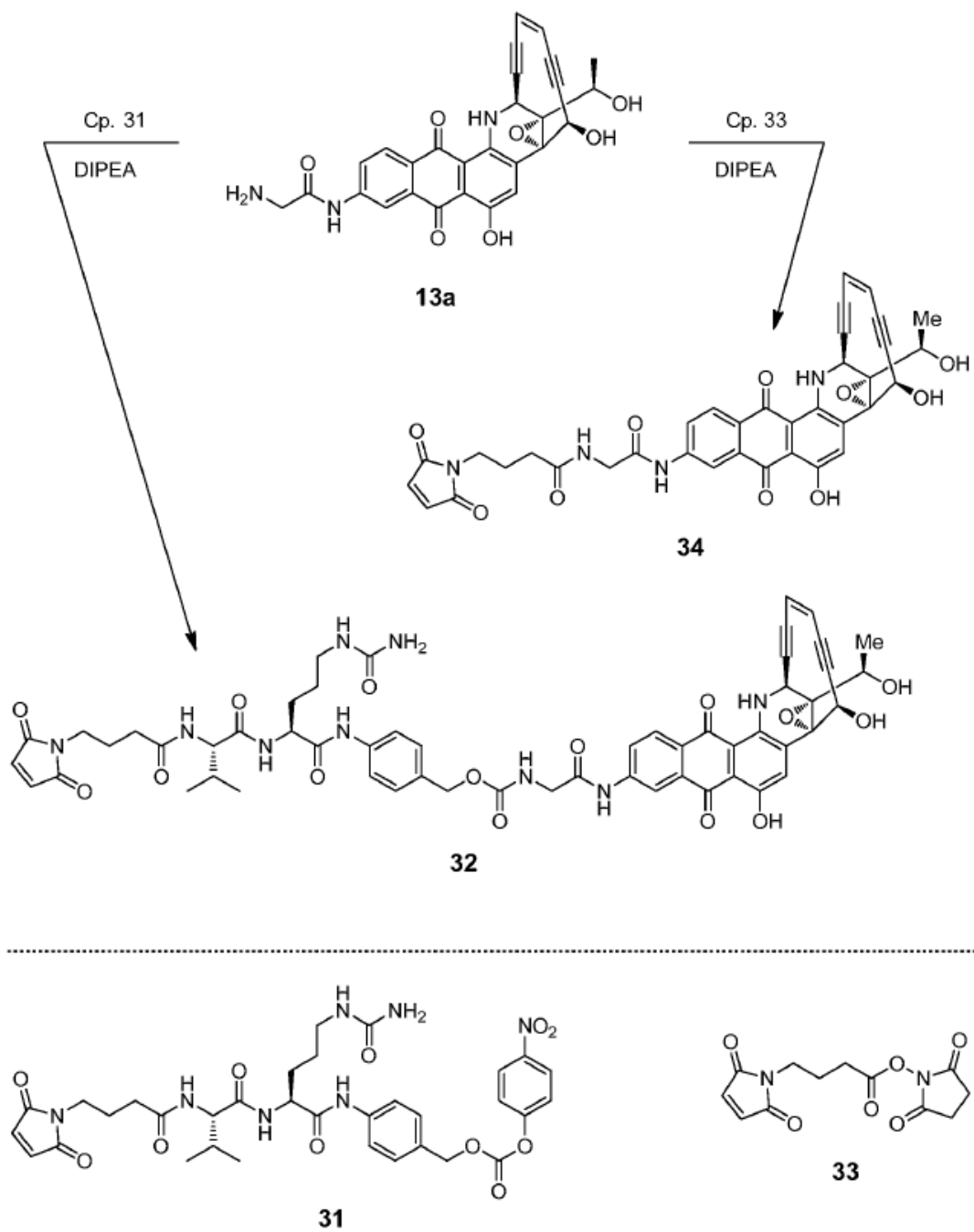
**Fig. 1**

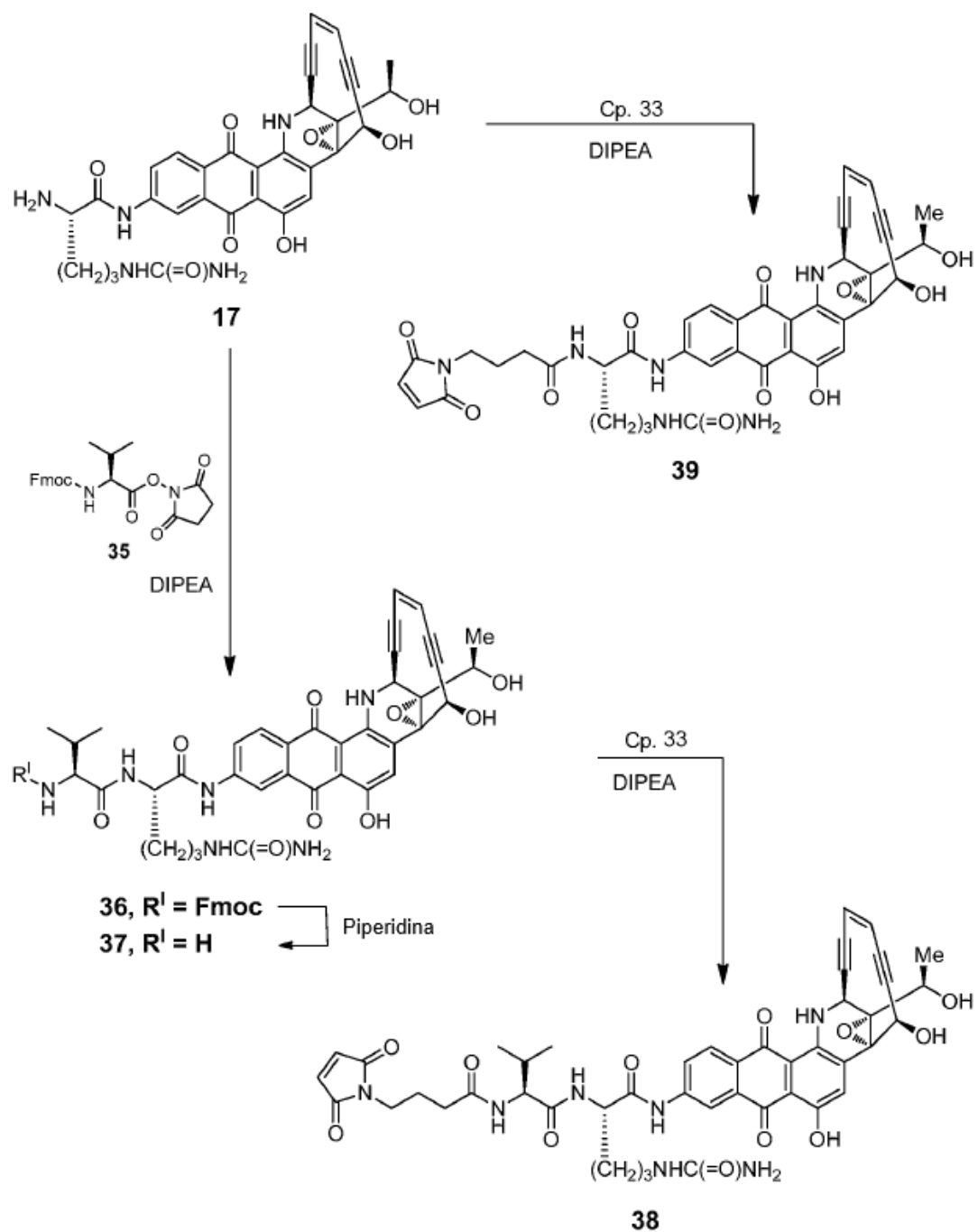
**Fig. 2**

**Fig. 3**

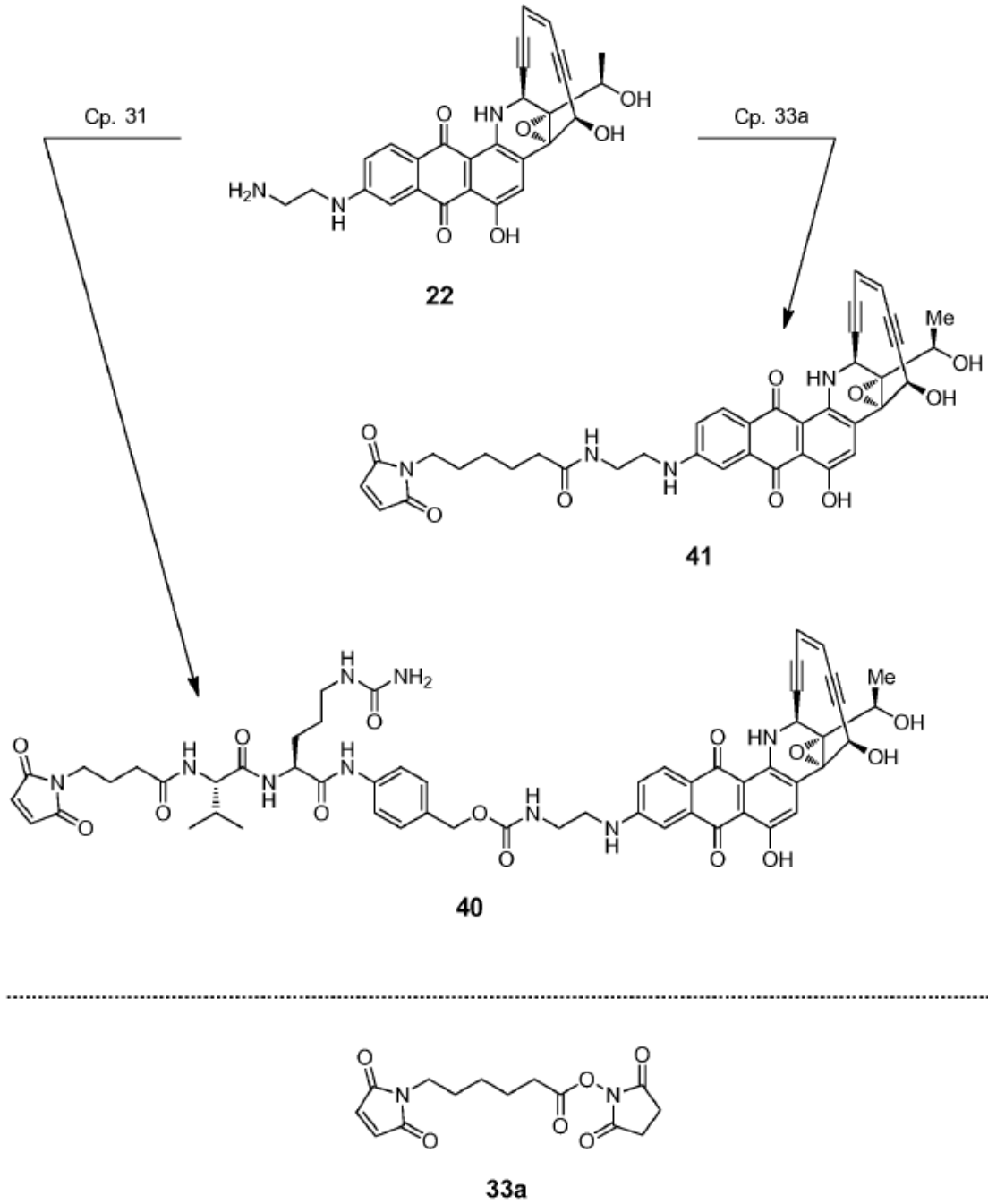
**Fig. 4**

**Fig. 5****Fig. 6**

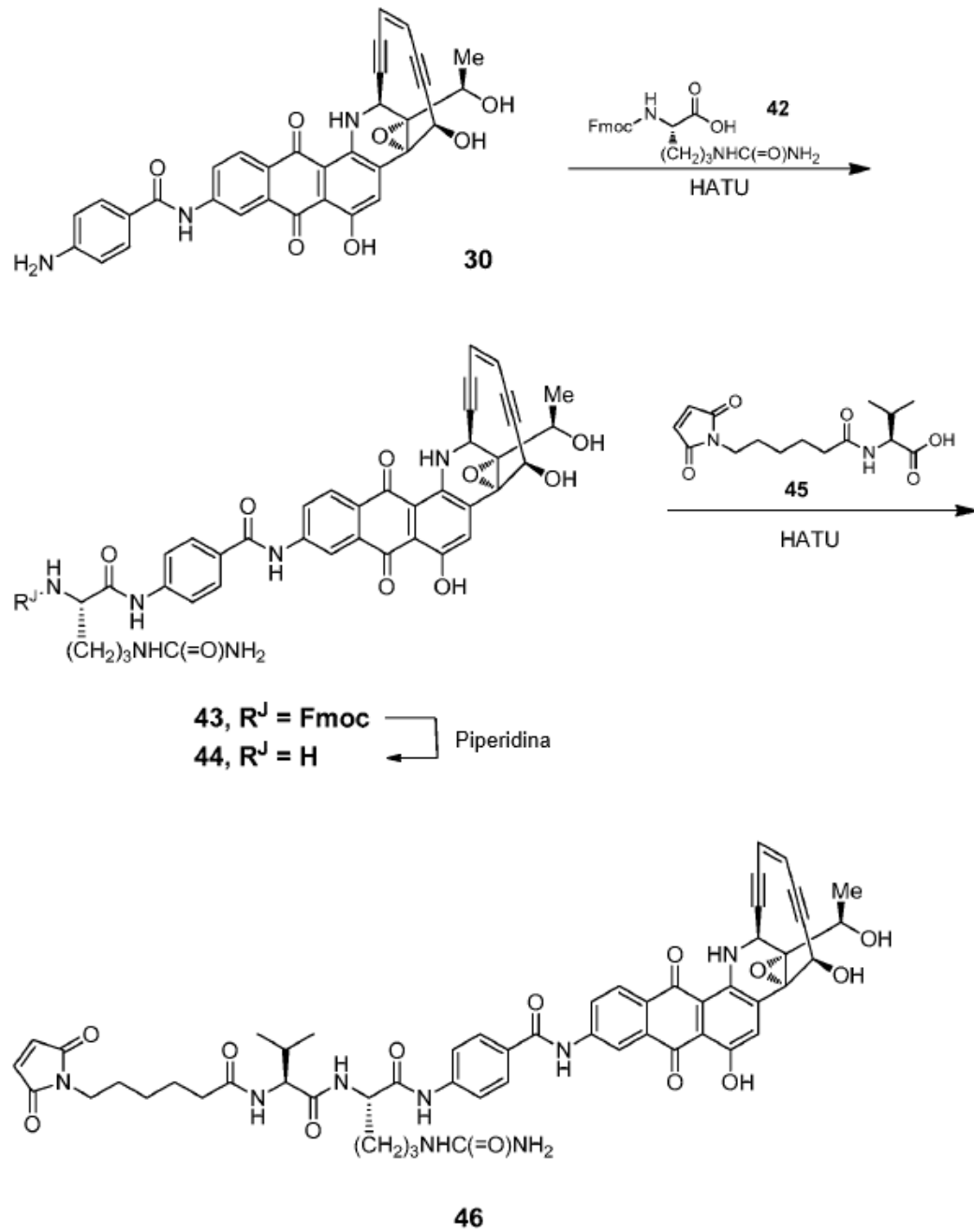
**Fig. 7**

**Fig. 8**

**Fig. 9**

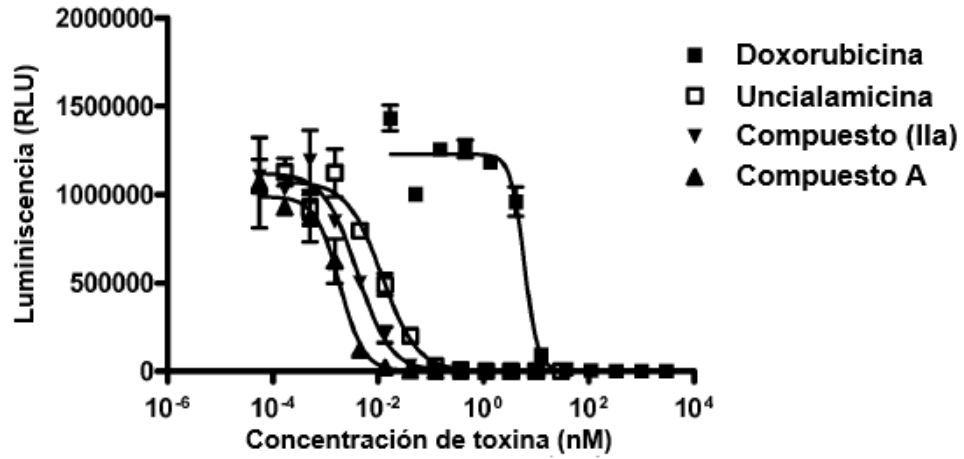




**Fig. 10**

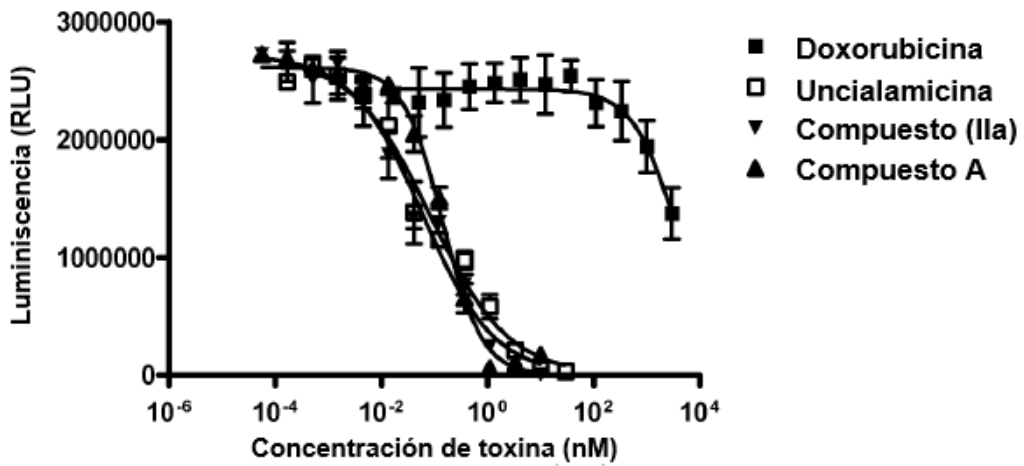
**Fig. 11a**

Actividad del Compuesto (IIa) contra Células de Leucemia HL-60



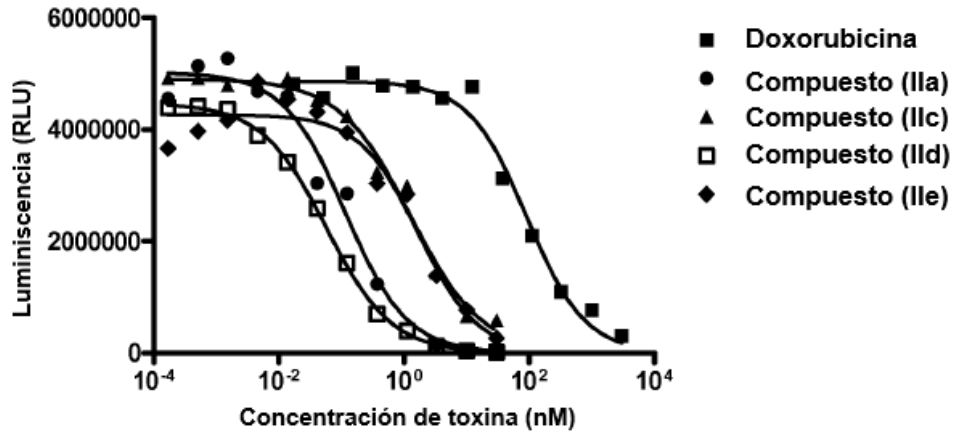
**Fig. 11b**

Actividad del Compuesto (IIa) contra Células Adr



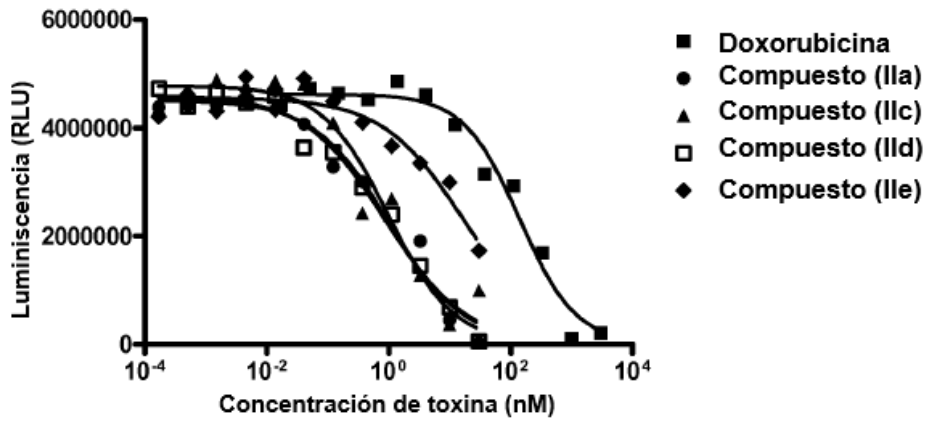
**Fig. 12a**

Actividad de los Compuestos contra Células 786-O

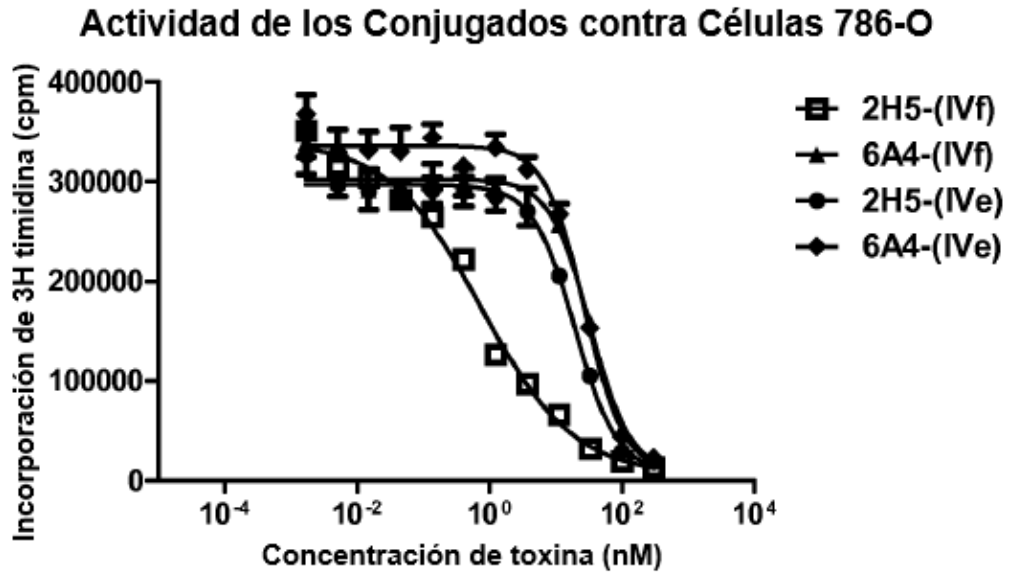


**Fig. 12b**

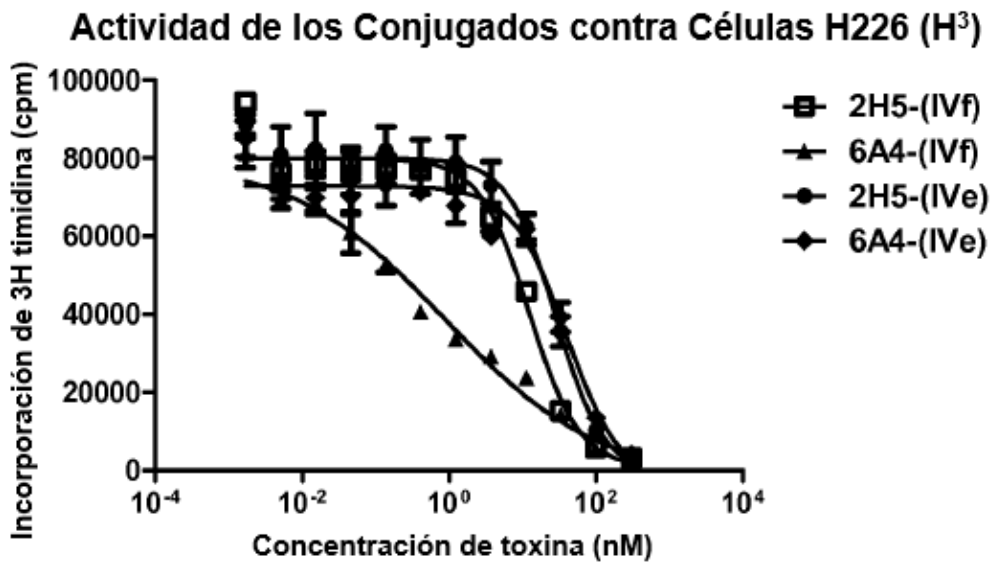
Actividad de los Compuestos contra Células H226



**Fig. 13a**



**Fig. 13b**



**Fig. 13c**

Actividad de los Conjugados contra Células H226 (ATP)

