

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 889 775**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2018 PCT/EP2018/082199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19101850**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2018 E 18811180 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.07.2021 EP 3713939**

54 Título: **Proceso mejorado para la síntesis del fármaco-enlazador vc-seco**

30 Prioridad:

24.11.2017 EP 17203457

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

13.01.2022

73 Titular/es:

**BYONDIS B.V. (100.0%)
Microweg 22
6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**JANOUSEK, VLADIMÍR y
KÁS, MARTIN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 889 775 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

Proceso mejorado para la síntesis del fármaco-enlazador vc-seco

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la síntesis del fármaco-enlazador vc-seco-DUBA y sus intermediarios, así como al uso de dicho proceso mejorado en un proceso para preparar un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el fármaco-enlazador vc-seco-DUBA.

10

Antecedentes de la presente invención

Las duocarmicinas son miembros de una familia de antibióticos antitumorales que incluyen duocarmicina A, duocarmicina SA y CC-1065. Son conocidos por sus potentes propiedades antitumorales, pero normalmente no se usan solos debido a su toxicidad extremadamente alta. Actualmente, se exploran las duocarmicinas como fármacos citotóxicos en conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).

15

Los ADC tienen el potencial de abordar la gran necesidad insatisfecha de nuevos tratamientos efectivos en el cáncer al dirigir el fármaco citotóxico altamente potente específicamente a las células cancerosas, lo que mejora así la eficacia mientras se reducen los efectos secundarios tóxicos sistémicos potenciales del fármaco de molécula pequeña.

20

Uno de los aspectos clave para el éxito comercial futuro de los ADC es un proceso para la síntesis del fármaco citotóxico y la construcción del fármaco-enlazador correspondiente, en el que se une un resto enlazador al fármaco citotóxico para facilitar la conjugación con el anticuerpo, cuyo proceso es adecuado para la producción a escala industrial.

25

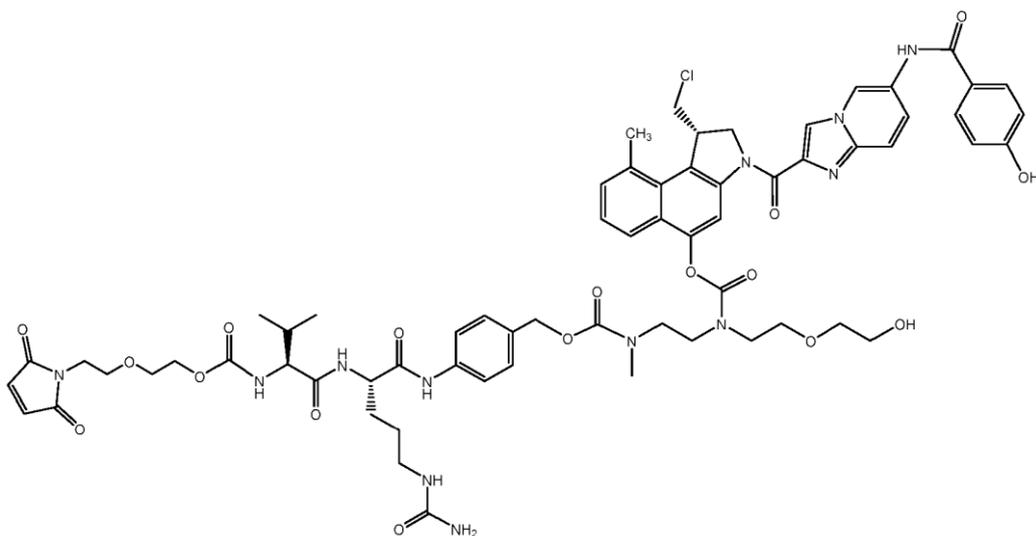
Fármaco-enlazador vc-seco-DUBA de Fórmula (I)

30

35

40

45



(I),

descrito por primera vez en el documento WO2011/133039 como compuesto **18b** en la pág. 210, 11. 21-27, es un ejemplo de un análogo de CC-1065 altamente potente. El ADC de vc-seco-DUBA con el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab, es decir, SYD985 o (vic-) trastuzumab duocarmazina, se usó con éxito en varios estudios preclínicos (M.M.C. van der Lee y otros, Molecular Cancer Therapeutics, 2015, 14(3), 692-703; J. Black y otros, Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15 (8), 1900-1909) y ensayos clínicos de fase I (ClinicalTrials.gov NCT02277717). Actualmente, el tratamiento con SYD985 se compara directamente con el tratamiento elegido por el médico en un ensayo clínico de fase III en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico HER2 positivo (TULIP; ClinicalTrials.gov NCT03262935).

55

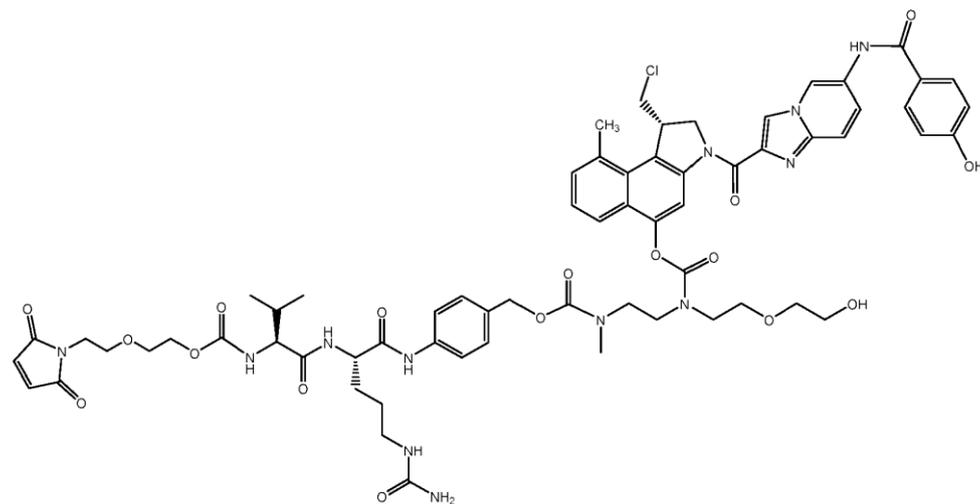
La síntesis del fármaco-enlazador vc-seco-DUBA se describe en el documento WO2011/133039 como un proceso de cuatro etapas. La preparación de vc-seco-DUBA al seguir este proceso a escala de laboratorio de 50-100 mg proporcionó el fármaco-enlazador con un rendimiento global de sólo el 21-25 %. Las dos últimas etapas, es decir, las etapas 3 y 4 de este proceso, son cruciales para el rendimiento global de vc-seco-DUBA del proceso total, al mostrar un rendimiento combinado de sólo aproximadamente el 50 %. A escala industrial, el rendimiento de este proceso de cuatro etapas será aún menor.

60

Descripción detallada de la presente invención

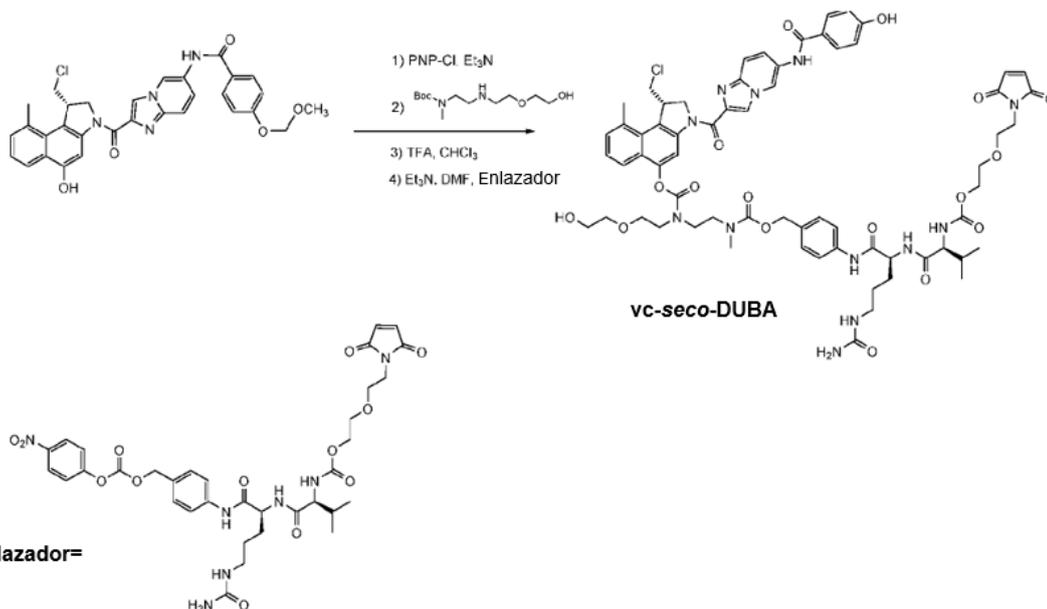
Las duocarmicinas son una clase de toxinas relacionadas estructuralmente que se aislaron por primera vez de un caldo de cultivo de especies de *Streptomyces*. Son miembros de una familia de antibióticos antitumorales que incluyen duocarmicina A, duocarmicina SA y CC-1065. Las duocarmicinas se unen al surco menor del ADN y posteriormente causan una alquilación irreversible del ADN. Esto altera la arquitectura del ácido nucleico, lo que eventualmente conduce a la muerte de las células tumorales.

El documento WO2011/133039 describe específicamente el fármaco-enlazador vc-seco-DUBA altamente potente de Fórmula (I) (compuesto **18b** en la pág. 210, 11. 21-27) que comprende un derivado de duocarmicina de CC-1065



La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la producción de vc-seco-DUBA con un rendimiento sorprendentemente alto y que puede aplicarse con éxito a escala industrial.

La síntesis química del fármaco-enlazador vc-seco-DUBA en el Ejemplo 10 del documento WO2011/133039 se describe como un proceso de cuatro etapas

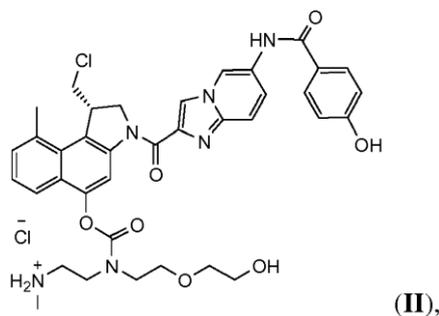


en donde PNP-Cl es cloroformiato de 4-nitrofenilo, Et₃N es trietilamina, Boc es *tert*-butiloxicarbonilo, TFA es ácido trifluoroacético, CHCl₃ es cloroformo y DMF es *N,N*-dimetilformamida.

En una escala de laboratorio de 50-100 mg, este proceso de cuatro etapas muestra un rendimiento general de solo 21-25 %. A escala industrial este rendimiento será significativamente menor.

El bajo rendimiento global de este proceso de cuatro etapas puede atribuirse en gran parte al bajo rendimiento combinado de sólo aproximadamente el 50 % a escala de laboratorio de las dos últimas etapas, es decir, las etapas 3 y 4. Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que un procedimiento modificado, que implicaba cambiar el reactivo ácido en la etapa 3, producía un nuevo intermediario que podía aislarse mediante cristalización. Inesperadamente, se encontró que este procedimiento modificado de la etapa 3 y el uso del nuevo intermediario resultó en un rendimiento considerablemente mayor de vc-seco-DUBA.

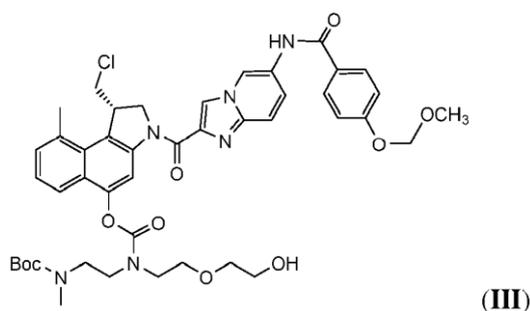
Normalmente, se introduce una etapa de cristalización en una síntesis química cuando es necesario aumentar la pureza del producto. Sin embargo, la introducción de dicha etapa suele reducir el rendimiento de dicho producto, ya que queda una cantidad considerable de producto en las aguas madres. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que la introducción de una etapa de cristalización en la síntesis de vc-seco-DUBA como se describe en la presente descripción anteriormente, que conduce al nuevo intermediario de Fórmula (II)



no sólo condujo a un aumento en la pureza (de 94-96 % a $\geq 99,0$ %), sino que también mostró un aumento inesperado y significativo en el rendimiento de vc-seco-DUBA (de 53 % a -79 %).

Por tanto, en una modalidad, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (II).

En una segunda modalidad, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (II) que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (III)



con cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano para formar el compuesto de Fórmula (II). Normalmente, el compuesto de Fórmula (III) se hace reaccionar con cloruro de hidrógeno al 10-20 % en masa en 1,4-dioxano. Preferiblemente, el compuesto de Fórmula (III) se hace reaccionar con 12-18 % de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano, más preferiblemente con 15 % de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano. Normalmente, la relación de masa del compuesto de Fórmula (III):HCl en 1,4-dioxano varía de 1:0,5 a 1:25. Preferiblemente, la relación de masa del compuesto de Fórmula (III):HCl en 1,4-dioxano varía de 1:1 a 1:10. Más preferiblemente de 1:5 a 1:10.

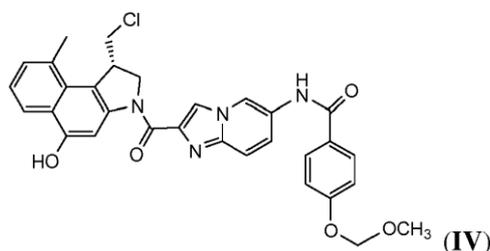
Normalmente, la cantidad de cloruro de hidrógeno es un exceso molar de la cantidad del compuesto de Fórmula (III). Preferiblemente, la cantidad de cloruro de hidrógeno es al menos 2 equivalentes molares de la cantidad del compuesto de Fórmula (III), más preferiblemente de 2 a 50 equivalentes.

Preferiblemente, dicha reacción tiene lugar en presencia de un removedor, tal como triisopropilsilano en agua y/o metanol. Dicha agua y/o metanol pueden estar presentes en una cantidad inferior al 25 % en masa de la masa total de disolvente, preferiblemente menos del 15 %, más preferiblemente menos del 10 %.

El compuesto de Fórmula (III) se puede preparar, como se describe, por ejemplo, en R.C. Elgersma y otros, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2015, 12(6), 1813-1835, mediante la reacción de un compuesto de Fórmula (IV)

5

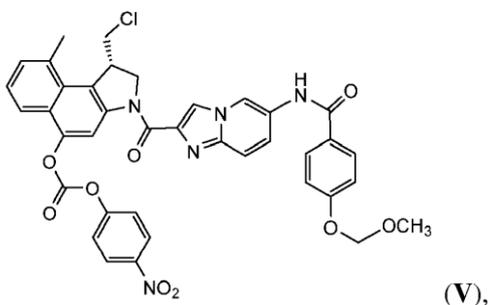
10



15 con cloroformiato de 4-nitrofenilo para formar un compuesto de Fórmula (V)

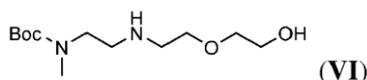
20

25



30 seguido de hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (V) con un compuesto de Fórmula (VI)

35



40

en presencia de 1-hidroxibenzotriazol hidratado para formar el compuesto de Fórmula (III).

45

Normalmente, la reacción del compuesto de Fórmula (IV) con cloroformiato de 4-nitrofenilo se realiza a una temperatura de 0 a 20 °C. Preferiblemente, la temperatura es de 0 a 10 °C, más preferiblemente de 0 a 6 °C, incluso más preferiblemente de 2 a 6 °C, más preferiblemente de 3 a 5 °C.

50

Los disolventes adecuados para usar en la preparación del compuesto de Fórmula (V) son, sin limitación, disolventes orgánicos, preferiblemente disolventes apróticos, más preferiblemente disolventes apróticos polares. Los disolventes preferidos son disolventes de éter, disolventes de amida o mezclas de los mismos. Los disolventes particularmente preferidos son tetrahidrofurano (THF), *N,N*-dimetilacetamida (DMA) o mezclas de los mismos. Lo más preferido es una mezcla de THF y DMA.

55

Las bases adecuadas para usar en la preparación del compuesto de Fórmula (V) son bases orgánicas, por ejemplo, aminas terciarias. Una base particularmente adecuada es Et₃N.

60

Normalmente, la reacción del compuesto de Fórmula (V) con el compuesto de Fórmula (VI) se realiza a una temperatura de 0 a 20 °C. Preferiblemente, la temperatura es de 0 a 10 °C, más preferiblemente de 4 a 10 °C.

65

Los disolventes adecuados para usar en la preparación del compuesto de Fórmula (III) son, sin limitación, disolventes orgánicos, preferiblemente disolventes apróticos, disolventes polares o mezclas de los mismos. Los disolventes preferidos son disolventes de éter, disolventes de amida o mezclas de los mismos. Los disolventes particularmente preferidos son THF, DMA o mezclas de los mismos. Lo más preferido es una mezcla de THF y DMA.

El compuesto de Fórmula (IV) puede producirse mediante, o de forma análoga a, cualquier proceso adecuado conocido en la técnica anterior, por ejemplo, el proceso descrito en el Ejemplo 6a del documento WO2015/185142.

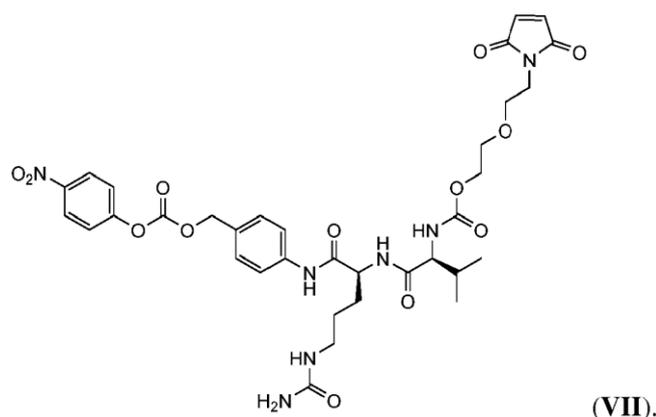
En otra modalidad, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula (II) para preparar vc-seco-DUBA.

En otra modalidad más, la presente invención se refiere a un proceso para preparar vc-seco-DUBA en el que un compuesto de Fórmula (II) se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula (VII)

5

10

15



20

Inesperadamente, el rendimiento de vc-seco-DUBA aumentó aún más cuando el compuesto de Fórmula (II) se hizo reaccionar con el compuesto de Fórmula (VII) mediante el uso de *N,N*-diisopropilamina (DIPEA) como base en lugar de trietilamina (Et_3N), que se usó en el Ejemplo 10 del documento WO2011/133039. Normalmente, la relación molar del compuesto de Fórmula (II):DIPEA varía de 1:1 a 1:15. Preferiblemente, la relación varía de 1:1 a 1:10, más preferiblemente de 1:2 a 1:7, incluso más preferiblemente de 1:3 a 1:5, más preferiblemente la relación es aproximadamente 1:4.

25

Normalmente, la reacción del compuesto de Fórmula (II) con el compuesto de Fórmula (VII) se realiza a una temperatura de 0 a 20 °C. Preferiblemente, la temperatura es de 0 a 10 °C, más preferiblemente de 0 a 5 °C.

30

Los disolventes adecuados para usar en la reacción de Fórmula (II) con el compuesto de Fórmula (VII) para preparar vc-seco-DUBA son, sin limitación, disolventes orgánicos, preferiblemente disolventes apróticos, más preferiblemente disolventes apróticos polares. Los disolventes preferidos son disolventes de éter, disolventes de amida o mezclas de los mismos. Los disolventes particularmente preferidos son THF, DMA, *N,N*-dimetilformamida (DMF) o mezclas de los mismos. El más preferido es DMA.

35

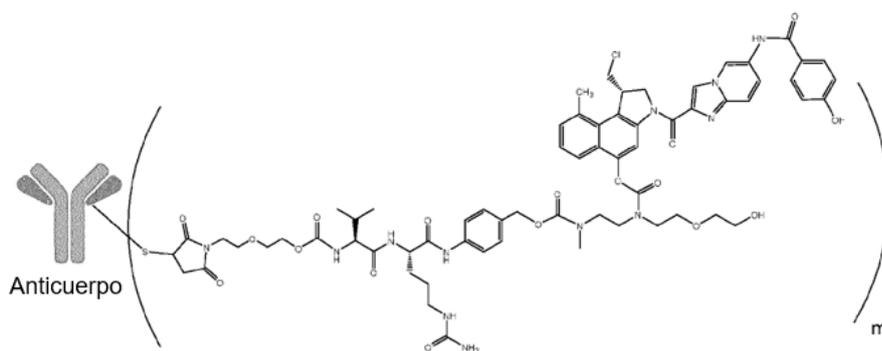
En una modalidad preferida, el proceso se realiza en presencia de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol. Normalmente, la relación molar del compuesto de Fórmula (II): hidrato de 1-hidroxibenzotriazol varía de 1:1 a 1:10. Preferiblemente, la relación varía de 1:1 a 1:7, más preferiblemente de 1:2 a 1:5, incluso más preferiblemente de 1:2 a 1:3, más preferiblemente la relación es aproximadamente 1:2,5.

40

La presente invención se refiere adicionalmente a un proceso para la preparación de un ADC vc-seco-DUBA de Fórmula (VIII)

45

50



55

en donde el compuesto fármaco-enlazador vc-seco-DUBA se prepara con el proceso de acuerdo con la invención como se describe en la presente descripción anteriormente.

60

m representa una relación promedio de fármaco a anticuerpo (DAR) de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1 a 4.

65

En el contexto de la presente invención, cualquier anticuerpo, en particular cualquier anticuerpo que se sepa que tiene actividad terapéutica o cualquier anticuerpo conocido en la técnica de los ADC, o cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, un fragmento F(ab)'_2 o Fab' , un anticuerpo monocatenario (sc), un scFv, un anticuerpo de dominio único (sd), un diacuerpo o un minicuerpo, se pueden usar para la conjugación (de tipo salvaje o específico de sitio) de vc-seco-DUBA. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo, tales como los anticuerpos

IgG, IgA o IgM. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferiblemente un anticuerpo IgG₁ o IgG₂. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanizados. Incluso más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG humanizado o humano, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal IgG₁ (mAb) humanizado o humano. Preferiblemente, dicho anticuerpo tiene cadenas ligeras κ (kappa), es decir, un anticuerpo IgG1-κ humanizado o humano.

En los anticuerpos humanizados, las regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno (CDR) en las regiones variables de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) se derivan de anticuerpos de una especie no humana, comúnmente ratón, rata o conejo. Estas CDR no humanas se pueden colocar dentro de un marco humano (región marco (FR) FR1, FR2, FR3 y FR4) de las regiones variables de HC y LC. Los aminoácidos seleccionados en las FR humanas pueden intercambiarse por los correspondientes aminoácidos originales de especies no humanas, por ejemplo, para mejorar la afinidad de unión, mientras se conserva una baja inmunogenicidad. Alternativamente, los marcos no humanos se retienen y los aminoácidos seleccionados de las FR de especies no humanas pueden intercambiarse por sus correspondientes aminoácidos humanos para reducir la inmunogenicidad, mientras se conserva la afinidad de unión del anticuerpo. Las regiones variables así humanizadas se combinan con regiones constantes humanas.

Estos anticuerpos se pueden producir de forma recombinante, sintética o mediante otros métodos adecuados conocidos en la técnica.

Normalmente, el anticuerpo es un anticuerpo mono-específico (es decir, específico para un antígeno; tal antígeno puede ser común entre especies o tener secuencias de aminoácidos similares entre especies) o biespecífico (es decir, específico para dos antígenos diferentes de una especie) que comprende al menos una región variable HC y LC que se une a una diana seleccionada del grupo que consiste en anexina A1, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242 (antígeno canceroso 242), CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30 (factor de necrosis tumoral 8), CD33, CD37, CD38 (ADP ribosa hidrolasa cíclica), CD40, CD44, CD47 (proteína asociada a integrina), CD56 (molécula de adhesión de células neurales), CD70, CD74, CD79, CD115 (receptor del factor estimulante de colonias 1), CD123 (receptor de interleucina-3), CD138 (Sindicán 1), CD203c (ENPP3), CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1 (molécula tipo lectina similar a C-1), CLL-1, c-MET (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), Cripto, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, EPh (por ejemplo, EphA2 o EphB3), ETBR (receptor de endotelina tipo B), FAP, FcRL5 (proteína similar al receptor Fc 5, CD307), FGFR (por ejemplo, FGFR3), FOLR1 (receptor de folato alfa), GCC (guanilil ciclasa C), GPNMB, HER2, HMW-MAA (antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular), integrina α (por ejemplo, αvβ3 y αvβ5), IGF1R, TM4SF1 (o antígeno L6), carbohidrato similar a Lewis A, Lewis X, Lewis Y (CD174), LIV1, mesotelina (MSLN), MN (CA9), MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, PD-1, PD-L1, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, antígeno 5T4 (o TPBG, glicoproteína trofoblasto), TF (factor tisular, tromboplastina, CD142), TF-Ag, Tag72, TNFR, TROP2 (transductor de señal de calcio 2 asociado a tumor), VEGFR y VLA.

Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen blinatumomab (CD19), epratuzumab (CD22), iratumumab y brentuximab (CD30), vadastuximab (CD33), tetulumab (CD37), isatuximab (CD38), bivatumumab (CD44), lorvotuzumab (CD56), vorsetuzumab (CD70), milatumumab (CD74), polatumumab (CD79), rovalpituzumab (DLL3), futuximab (EGFR), oportuzumab (EPCAM), farletuzumab (FOLR1), glembatumumab (GPNMB), trastuzumab y pertuzumab (HER2), etaracizumab (integrina), anetumab (mesotelina), pankomab (MUC1), enfortumab (Nectina-4) y H8, A1 y A3 (antígeno 5T4).

La conjugación del fármaco-enlazador vc-seco-DUBA con el anticuerpo puede realizarse como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2011/133039, WO2015/177360 y WO2017/137628.

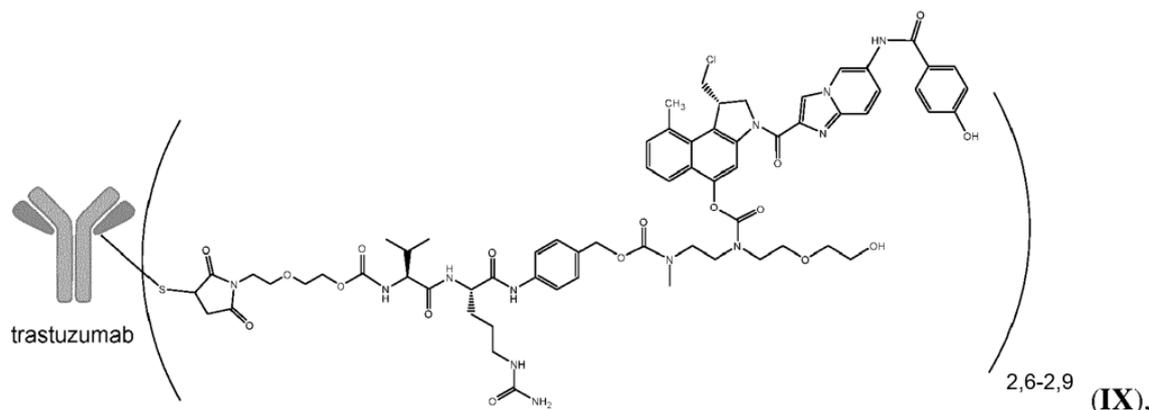
Los ADC de tipo salvaje se producen al conjugar el fármaco-enlazador con el anticuerpo a través de los tioles libres de las cadenas laterales de las cisteínas generadas mediante la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios. La fabricación implica la reducción parcial de los disulfuros intercatenarios expuestos al disolvente seguida de la modificación de los tioles resultantes con fármacos-enlazadores que contienen maleimida. La estrategia de unión de cisteína resulta en un máximo de dos fármacos por disulfuro reducido. La mayoría de las moléculas de IgG humanas tienen cuatro enlaces disulfuro expuestos al disolvente, por lo que es posible un intervalo de cero a ocho fármacos por anticuerpo. El número exacto de fármacos por anticuerpo se determina mediante el grado de reducción de disulfuro y el número de equivalentes molares de fármaco-enlazador usados en la reacción de conjugación siguiente. La reducción completa de los cuatro enlaces disulfuro da una construcción homogénea con ocho fármacos por anticuerpo, mientras que una reducción parcial normalmente resulta en una mezcla heterogénea con cero, dos, cuatro, seis u ocho fármacos por anticuerpo.

Los ADC específicos de sitio se producen mediante la conjugación del fármaco-enlazador al anticuerpo a través de las cadenas laterales de residuos de cisteína modificados genéticamente en posiciones adecuadas del anticuerpo mutado. Las cisteínas modificadas genéticamente suelen estar tapadas por otros tioles, como la cisteína o el glutatión, para formar disulfuros. Estos residuos tapados deben destaparse antes de que se produzca la unión del fármaco. La unión del fármaco a los residuos modificados genéticamente se logra mediante la reducción tanto de los disulfuros intercatenarios nativos como mutantes, luego al reoxidar las cisteínas intercatenarias nativas mediante el uso de un oxidante suave tal como CuSO₄ o ácido deshidroascórbico, seguido de la conjugación estándar de la cisteína

modificada genéticamente sin tapar con un fármaco-enlazador, o mediante el uso de agentes reductores suaves que reducen los disulfuros mutantes a una velocidad mayor que los enlaces disulfuro intercatenarios, seguido de la conjugación estándar de la cisteína modificada genéticamente sin tapar con un fármaco-enlazador. En condiciones óptimas, se unirán dos fármacos por anticuerpo (es decir, la relación de fármaco a anticuerpo, DAR, es 2) (si una cisteína se modifica genéticamente en la cadena pesada o la cadena ligera del mAb).

En una modalidad preferida, el anticuerpo a usar de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-HER2, incluso más preferido el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab.

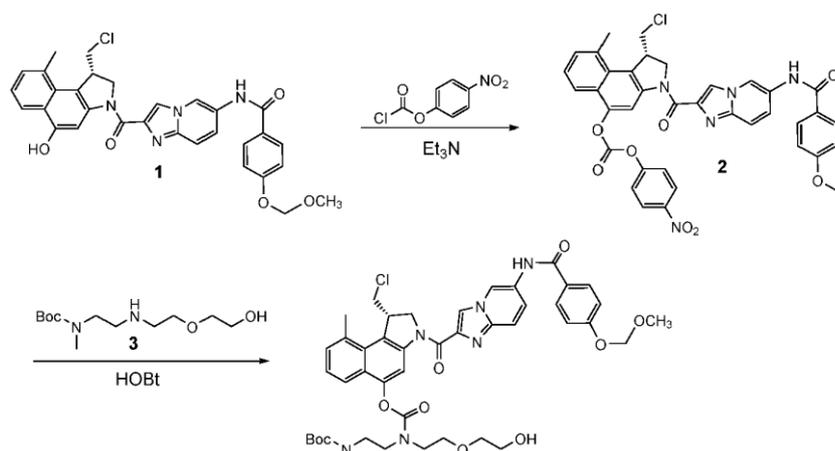
En una modalidad particular, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un ADC trastuzumab vc-seco-DUBA de Fórmula (IX)



en donde el compuesto fármaco-enlazador vc-seco-DUBA se prepara con el proceso de acuerdo con la invención como se describe en la presente descripción anteriormente. 2,6-2,9 representa un DAR promedio de 2,6-2,9.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (4)



Se hizo reaccionar metilCBI-azaindol-benzamida-MOM (1) (1,0 g, 1,75 mmol) con cloroformiato de 4-nitrofenilo (PNP-Cl) (0,43 g, 2,12 mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (THF) (4,5 g) y *N,N*-dimetilacetamida (DMA) (3,0 g) en presencia de trietilamina (Et_3N) (0,55 g, 4,94 mmol) durante aproximadamente 1,5 horas a una temperatura de 0 °C y se dejó calentar hasta 6 °C. Se obtuvo una suspensión que comprendía metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-PNP (2).

En la segunda etapa, se disolvió (2-((2-(2-hidroxietoxi)etil) amino)etil)(metil)-carbamato de *tert*-butilo (3) (0,58 g, 2,19 mmol) en DMA (1,7 g) y se añadió hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,35 g, 2,28 mmol). Esta solución obtenida se hizo reaccionar con la suspensión durante 1,5 horas a una temperatura de 4 °C y se dejó calentar hasta 10 °C.

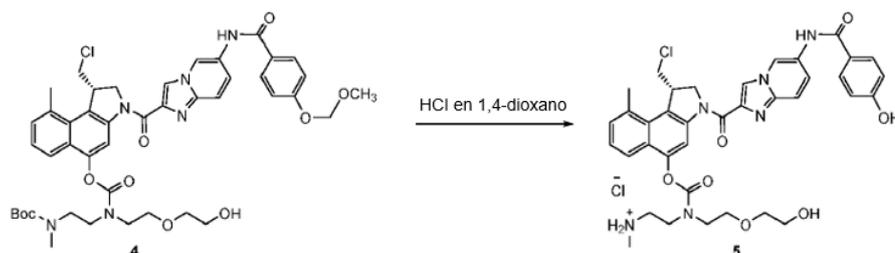
Una vez completada la reacción, se añadió acetato de etilo (EtOAc) (8,8 g) a la mezcla de reacción y la solución se lavó con salmuera (11,3 g), solución saturada de bicarbonato de sodio (3,8 g) y nuevamente con salmuera (3,8 g). La capa orgánica se separó y se purificó mediante filtración con carbón. El disolvente se evaporó en un evaporador

rotatorio de vacío. La metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (**4**) obtenida se disolvió en acetona (20 g) y, finalmente, se purificó de nuevo mediante filtración con carbón.

El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, al eluir con una fase móvil - DCM:MeOH = 97:3 a 94:6. Las fracciones de producto combinadas se concentraron y se secaron *al vacío* para producir metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (**4**) (1,27 g, 1,48 mmol; 84 % de rendimiento, 93,82 % de pureza).

Ejemplo 2 - Preparación de vc-seco-DUBA

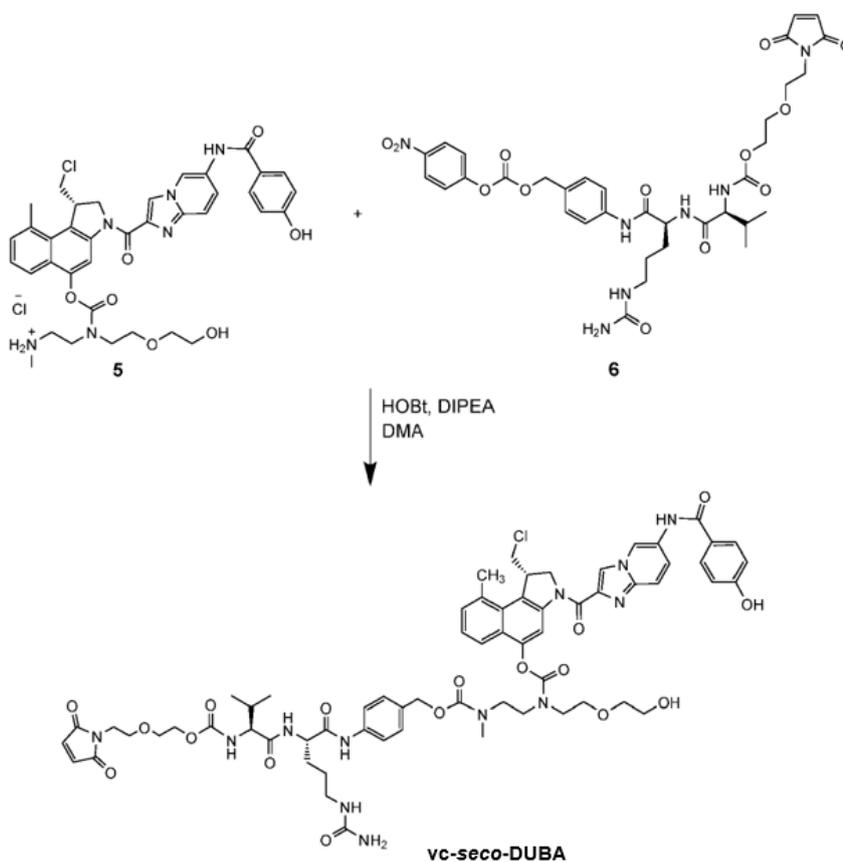
Preparación de clorhidrato de metilCBI-azaindol-benzamida-etilendiamina-D (**5**)



Los grupos metoximetilo (MOM) y *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) de metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (**4**) (1,27 g, 1,48 mmol) se eliminaron con cloruro de hidrógeno (HCl) al 15 % en 1,4-dioxano (7,5 g) en presencia de un removedor (trisisopropilsilano (0,63 g), agua (0,4 g) y metanol (0,3 g)). El clorhidrato de metilCBI-azaindol-benzamida-etilendiamina-D (**5**) cristalizó a partir de la solución de reacción como un sólido amarillo.

El sólido amarillo obtenido se filtró, se lavó con acetona y se secó sobre el filtro mediante el uso de nitrógeno y vacío y proporcionó un producto puro (**5**) (1,0 g, 1,33 mmol; 90 % de rendimiento, ≥ 90 % de pureza).

Preparación de vc-seco-DUBA



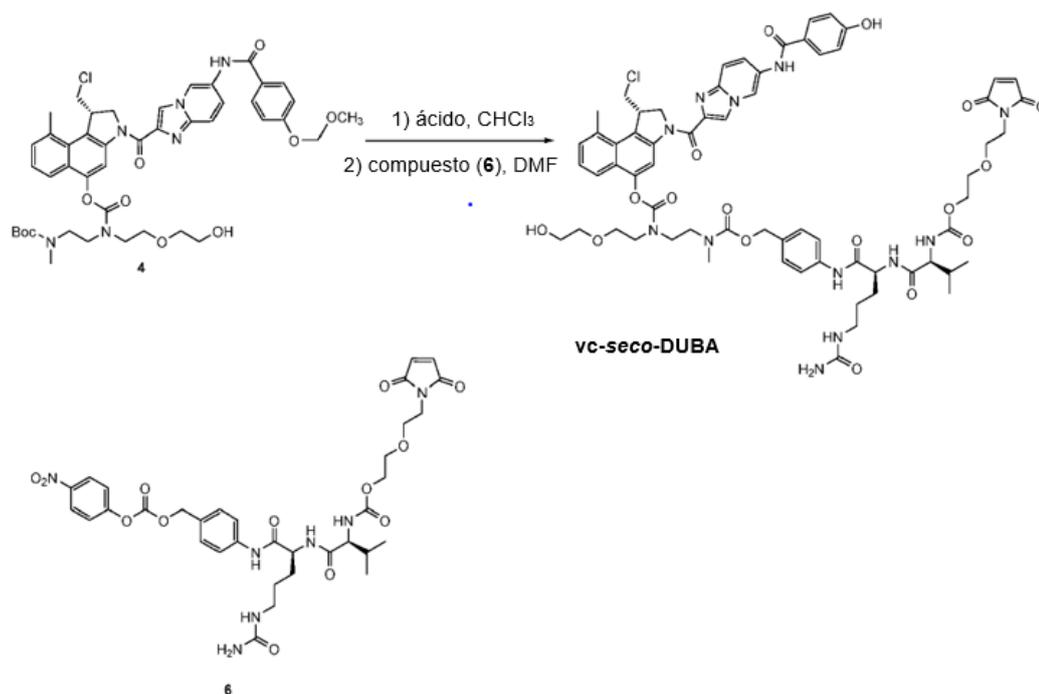
Se hizo reaccionar clorhidrato de metilCBI-azaindol-benzamida-etilendiamina-D (**5**) (1,0 g, 1,33 mmol) durante 1,5 horas en la oscuridad a una temperatura de 0 °C y se dejó calentar hasta 5 °C con maleimida-OEG₂-val-cit-PABA-PNP (**6**) (0,98 g, 1,29 mmol) en DMA (17,8 g) en presencia de *N,N*-diisopropilamina (DIPEA) (0,65 g, 5,10 mmol) y HOBT (0,47 g, 3,16 mmol). La mezcla de reacción se añadió gota a gota a agua (201,1 g) a una temperatura de 23 a 25 °C (50 a 60 min) y se obtuvo un precipitado de producto crudo vc-seco-DUBA. Después de 30 min de agitación, el producto crudo precipitado se filtró en un filtro de presión. La torta del filtro se lavó a fondo con agua y se secó en el filtro al vacío y con una ligera corriente de nitrógeno.

El producto crudo vc-seco-DUBA se sometió primero a cromatografía ultrarrápida a baja presión (fase estacionaria - gel de sílice de 0,040 a 0,063 mm; fase móvil - diclorometano:metanol = 90:10). Las fracciones que cumplen (con pureza UPLC-IN de vc-seco-DUBA ≥ 90 %) se recogieron en un matraz, se filtraron y se evaporaron. Se realizó una purificación adicional mediante cromatografía preparativa (fase estacionaria - gel de sílice de 0,015 a 0,040 mm; fase móvil - diclorometano:metanol = 90:10 a 85:15). Las fracciones que cumplen (con pureza UPLC-IN de vc-seco-DUBA ≥ 90 %) se recogieron en un matraz y el disolvente se cambió a DMA. La concentración se realizó a una temperatura máxima de 25 °C. Las soluciones concentradas se combinaron, se filtraron mediante un filtro de 0,2 μm y se añadieron a agua para precipitar vc-seco-DUBA puro como un polvo amarillo fino (rendimiento: 35-45 %; pureza: ≥ 99,0 %).

El producto se filtró, se lavó con agua y se secó en el filtro mediante el uso de nitrógeno y vacío a una temperatura máxima de 25 °C.

Ejemplo comparativo - Preparación de vc-seco-DUBA

La síntesis de vc-seco-DUBA se realiza al seguir el procedimiento descrito en el Ejemplo 10 del documento WO2011/133039.



Etapa 1

MetilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (**4**) (0,1 mmol) se suspendió en cloroformo (CHCl₃) (6 ml) y se enfrió en hielo. Se añadieron 2 ml de ácido (ácido trifluoroacético (TFA) o HCl al 15 % en 1,4 dioxano (7,5 g)) y la mezcla se agitó durante 3 h. Después, la mezcla se concentró *al vacío*.

Etapa 2

El residuo se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (4 ml), la solución se enfrió en hielo y se añadieron maleimida-OEG₂ val-cit-PABA-PNP (**6**) (0,13 mmol) y la base (1 mmol, Et₃N o DIPEA). La mezcla se agitó durante 2 horas, se concentró *al vacío* y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO₂, diclorometano:metanol, 1:0 a 8:2).

5 El procedimiento anterior se realizó mediante el uso de HCl en 1,4-dioxano o el ácido TFA de la técnica anterior para eliminar los grupos MOM y Boc de metilCBI-azaindol-benzamida-MOM-Boc-etilendiamina-D (4) en la primera etapa y mediante el uso ya sea de DIPEA o la base Et₃N de la técnica anterior para facilitar la reacción de acoplamiento de clorhidrato de metilCBI-azaindol-benzamida-etilendiamina-D (5) y maleimida-OEG₂-val-cit-PABA-PNP (6) en la etapa 2 en orden de determinar la influencia de la elección del ácido y la base en la eficiencia de la preparación de vc-seco-DUBA.

La siguiente tabla muestra el rendimiento de vc-seco-DUBA.

10

Ácido usado en la Etapa 1	Base usada en la Etapa 2	Intermediario (5) aislado	Rendimiento (%)
TFA*	Et ₃ N *	No	52,96
TFA	DIPEA	No	29,32
HCl en 1,4-dioxano	Et ₃ N	Sí	78,76
HCl en 1,4-dioxano	DIPEA	Sí	82,80

15 *Ácido y reactivo usados en el proceso de la técnica anterior (Documento WO2011/133039)

20 El uso de HCl en 1,4-dioxano en lugar de TFA en la etapa 1 resultó en un aumento del 25,8 % en el rendimiento global de vc-seco-DUBA determinado mediante HPLC. El uso de DIPEA en lugar de Et₃N en la etapa 2 resultó en una disminución del 23,6 % en el rendimiento global de vc-seco-DUBA determinado mediante HPLC. Sin embargo, el uso de HCl en 1,4-dioxano en la etapa 1 y DIPEA en la etapa 2 resultó en un aumento del 29,8 % en el rendimiento global de vc-seco-DUBA determinado mediante HPLC.

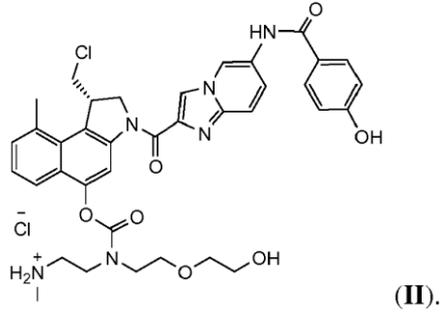
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (II)

5

10

15

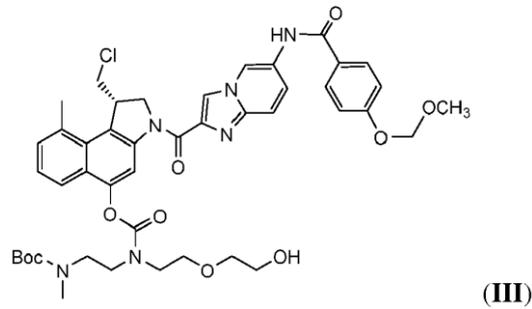


2. Un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (III)

20

25

30



con cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano para formar el compuesto de Fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 1.

35

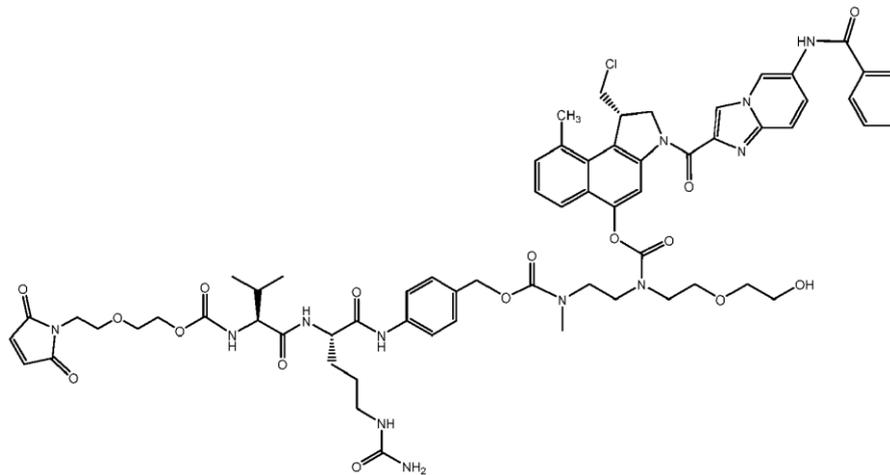
3. El uso del compuesto de Fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 1 para preparar vc-seco-DUBA de Fórmula (I)

40

45

50

55



4. Un proceso para la síntesis de vc-seco-DUBA de Fórmula (I)

60

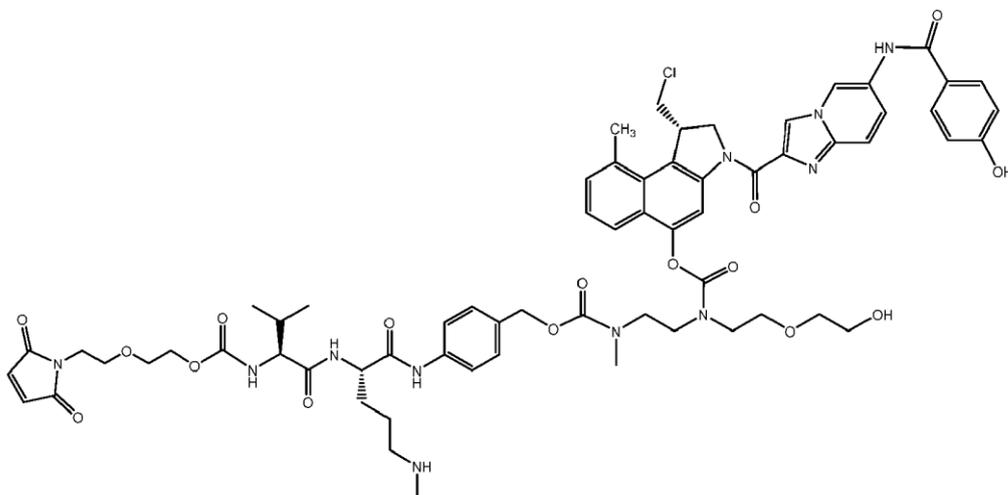
65

5

10

15

20



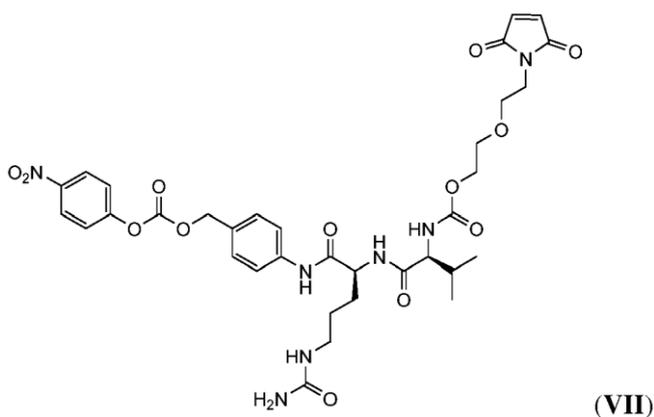
que comprende hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (II) de acuerdo con la reivindicación 1 con un compuesto de Fórmula (VII)

25

30

35

40



(VII)

para formar el compuesto de Fórmula (I).

5.
45

El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la reacción del compuesto de Fórmula (II) y el compuesto de Fórmula (VII) se realiza en presencia de *N,N*-diisopropilamina.

6.
50

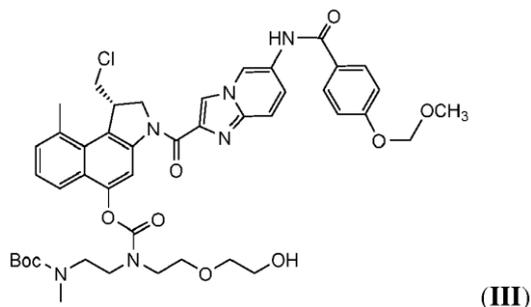
El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la reacción del compuesto de Fórmula (II) y el compuesto de Fórmula (VII) se realiza en *N,N*-dimetilacetamida en presencia de *N,N*-diisopropilamina e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol.

7.
55

El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el compuesto de Fórmula (II) se prepara al hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (III)

55

60



(III)

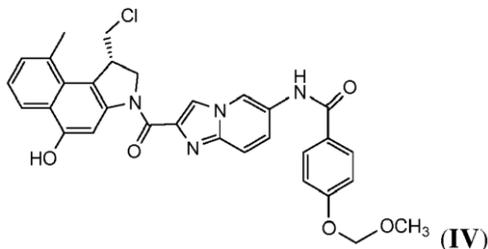
65

con cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano para formar el compuesto de Fórmula (II).

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el compuesto de Fórmula (III) se prepara al hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IV)

5

10

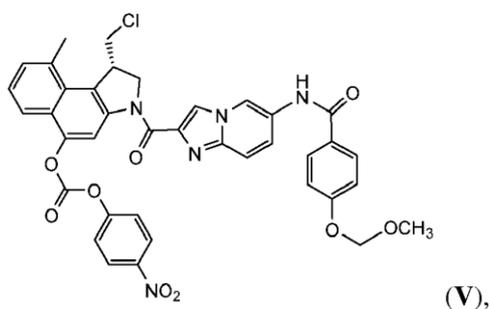


15

con cloroformiato de 4-nitrofenilo para formar un compuesto de Fórmula (V)

20

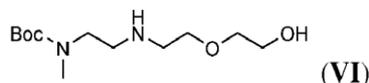
25



30

seguido de hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (V) con un compuesto de Fórmula (VI)

35



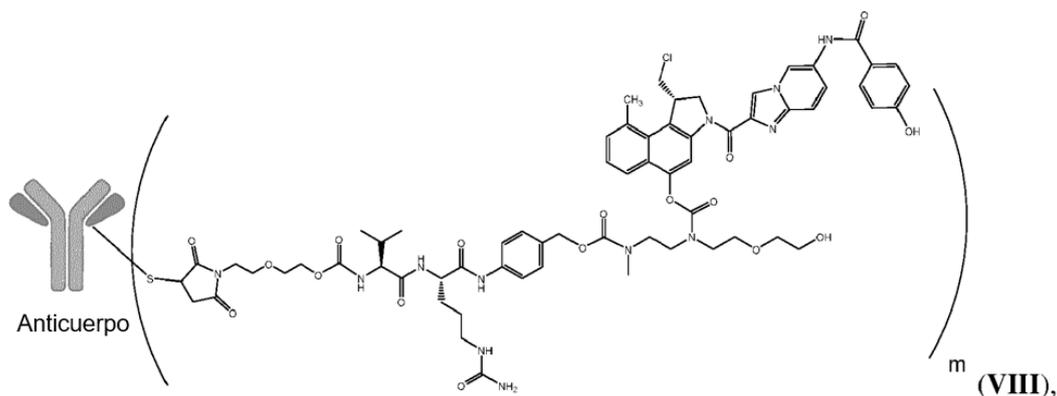
en presencia de 1-hidroxibenzotriazol hidratado para formar el compuesto de Fórmula (III).

9. Un proceso para la síntesis de un conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (VIII)

45

50

55



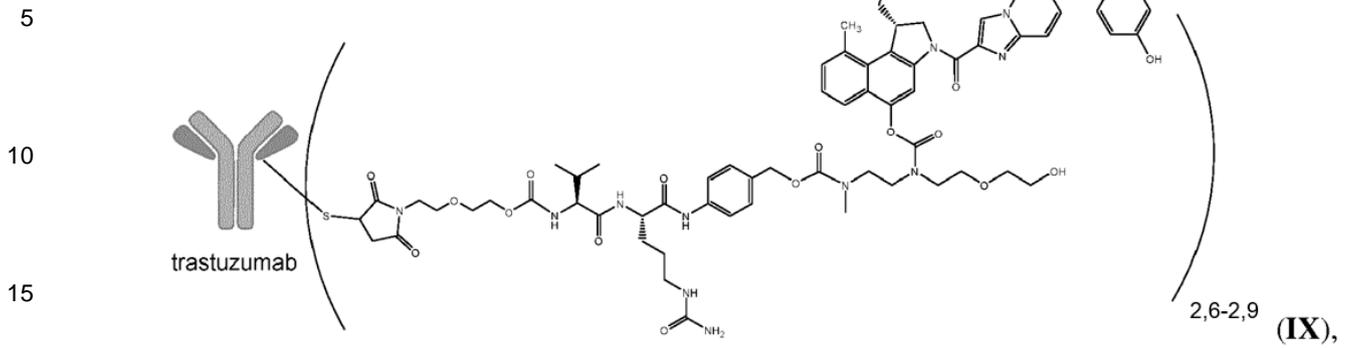
que comprende el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para formar el compuesto de Fórmula (I), seguido de la conjugación del compuesto de Fórmula (I) con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo,

en donde Anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y m representa una relación promedio de fármaco a anticuerpo de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 6, más preferiblemente de 1 a 4.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el compuesto de Fórmula (I) se conjuga con el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab.

65

11. Un proceso para la síntesis de un conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula (IX)



20 que comprende el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para formar el compuesto de Fórmula (I), seguido de la conjugación del compuesto de Fórmula (I) con el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab, en donde 2,6-2,9 representa una relación promedio de fármaco a anticuerpo de 2,6 a 2,9.

25